

愛知県衛生研究所報

第 60 号 平成 22 年 3 月

目 次

調査研究

愛知県感染症発生動向調査 2009 年定点把握疾病の概要と インフルエンザ罹患数推計	1
---	---

續木雅子 竹島雅之 広瀬かおる 判治岳史 皆川洋子

食品からのカンピロバクター菌検出法の開発	9
----------------------	---

平松礼司 青木日出美 下岸 協 遠山明人 皆川洋子

ブロス NPD 方式ガスクロマトグラフィーによる 食品中の多成分残留農薬分析法の検討	15
---	----

上野英二 大野春香 棚橋高志 大島晴美 三上栄一

成人における生体内微量元素の 1 日尿中排泄量及び 必須元素の摂取状況モニタリング法に関する研究	23
---	----

林 留美子 小島美千代 椛島由佳 三上栄一

新型インフルエンザ A/H1N1 発生に対する愛知県衛生研究所の対応検証 (第 1 報) 全数報告期の総括	29
--	----

皆川洋子 安井善宏 秦 眞美 小林慎一 伊藤 雅
藤原範子 水谷絵美 安達啓一 山下照夫 下岸 協
續木雅子 竹島雅之 広瀬かおる 判治岳史 遠山明人

他誌掲載論文抄録	41
----------	----

Report of Aichi Prefectural Institute of Public Health
(Aichi-ken Eisei Kenkyusyo)

Volume 60, March 2010

Contents

Original Papers

Features of infectious disease surveillance system in Aichi Prefecture - Epidemics of infectious diseases and estimation of influenza incidence in 2009 -	1
Masako Tsuzuki, Masayuki Takeshima, Kaoru Hirose, Takeshi Hanji, Hiroko Minagawa	
Studies on advanced methods for detecting <i>Campylobacter</i> spp. in food samples	9
Reiji Hiramatsu, Hidemi Aoki, Kyou Shimogishi, Akito Tohyama, Hiroko Minagawa	
Multi-residue analysis of pesticides in foods by gas chromatography with bios NPD	15
Eiji Ueno, Haruka Ohno, Takashi Tanahashi, Harumi Oshima, Eiichi Mikami	
Estimation of daily intake of trace elements based on the measurement of trace element excretion levels in the 24-hour urine samples from healthy adults	23
Rumiko Hayashi, Michiyo Kojima, Yuka Kabashima, Eiichi Mikami	
Preliminary report of our response against the emergence and pandemic of swine-origin influenza A/H1N1 in Aichi Prefecture (I) Case-based surveillance phase (April thorough July, 2009)	29
Hiroko Minagawa, Yoshihiro Yasui, Mami Hata, Shinichi Kobayashi, Miyabi Ito, Noriko Fujiwara, Emi Mizutani, Hirokazu Adachi, Teruo Yamashita, Kyou Shimogishi, Masako Tsuzuki, Masayuki Takeshima, Kaoru Hirose, Takeshi Hanji, Akito Tohyama	
Summeries of papers accepted to other journals	41

調 査 研 究

愛知県感染症発生動向調査 2009 年定点把握疾病の概要と インフルエンザ罹患数推計

續木雅子 竹島雅之 広瀬かおる 判治岳史 皆川洋子

要 旨

2009 年 12 月現在、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」に基づく感染症発生動向調査には全数報告が 74 疾病、定点把握は週報告 18 疾病及び月報告 7 疾病が指定され、患者発生報告が行われている。愛知県分の情報は、国への報告後速やかに「愛知県感染症情報」として還元している。愛知県衛生研究所企画情報部では情報収集・還元方法の改良及び感染症サーベイランス情報のさらなる有効活用に取り組んでいる。動向報告における増減の把握をより容易にすることを目的に、過去 5 年間の同時期の週別比較グラフを作成し 2009 年の定点把握疾病の流行状況を検討した。また、インフルエンザ定点当たり報告数に基づき愛知県における罹患数推計を行った。その結果、2009 年 1～53 週に医療機関を受診したインフルエンザ罹患患者の推計値は約 142 万人、ほぼ全てが新型インフルエンザ (A/H1N1) とみなされる 31 週以降の推計値は約 90 万人であった。愛知県内では 2009 年 1 年間に、5.3 人に 1 人がインフルエンザで医療機関を受診したと推定された。

キーワード：感染症発生動向調査、定点把握疾病、インフルエンザ、罹患数推計

序 文

感染症発生動向調査は、平成 11 年 4 月に施行された「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」の大きな柱の一つに位置づけられている。感染症患者発生状況の正確な把握と分析、その結果の的確な提供・公開は感染症対策の基本とされ、愛知県衛生研究所企画情報部内には指定都市(名古屋市)及び中核市(豊橋市、岡崎市、豊田市)を含めた愛知県の基幹地方感染症情報センターが設置されている。愛知県では愛知県感染症発生動向調査事業実施要綱に基づき、小児科定点 182 か所、インフルエンザ定点 195 か所、眼科定点 35 か所、

基幹定点 17 か所から報告されたデータを国へ報告している。同時に「愛知県感染症情報」(週報)を発行 (<http://www.pref.aichi.jp/eiseiken/2f/kansen.html>) し、各疾病の最新の患者報告数を過去数年間のデータとともに示し、定点当たり報告数の推移等をグラフ化して情報還元を行っている。さらに感染症サーベイランスから得られる情報のさらなる有効活用、情報収集・還元方法の改良を目指して以下のとおり取り組んでいる。

感染症監視体制が有効に機能するためには通常発生レベルの把握が不可欠である。そこで過去 5 年間の同時期の定点当たり報

告数の平均を算出、2009年の定点把握疾病の流行状況を比較検討した。また、感染症発生動向調査の主目的となっている流行の早期把握(sentinel surveillance)に加え、副次的目的として定点把握対象疾病の罹患数推計に着目した。インフルエンザは汎流行(pandemic)が数十年に一度発生し、罹患者の集中的発生に伴う脳炎・肺炎等の合併症例の急増など個人及び社会全体への影響は大きく、行政や医療分野において重大な問題となる。2009年4月にメキシコで発生が探知され6月には県内でも患者が確認された新型インフルエンザ(A/H1pdmN1)の流行は、愛知県における感染症予防対策が直面する課題であり、今後懸念される第2波発生等に対して引き続き対策が求められる。そこでインフルエンザ定点当たり報告数から愛知県全体の罹患数推計を試みたのでこれらを報告する。

資 料

愛知県感染症発生動向調査事業実施要綱に基づき、指定届出機関(小児科定点 182か所、インフルエンザ定点 195か所、眼科定点 35か所、基幹定点 17か所)から報告された定点把握対象の五類感染症のうち 14疾病(表1)の2004年～2009年定点当たり報告数を用いた。

表1 対象疾病

インフルエンザ定点対象疾病

インフルエンザ

小児科定点対象疾病

RSウイルス感染症
咽頭結膜熱
A群溶血性レンサ球菌咽頭炎
感染性胃腸炎
水痘
手足口病
伝染性紅斑
突発性発しん
百日咳
ヘルパンギーナ
流行性耳下腺炎

眼科定点対象疾病

急性出血性結膜炎
流行性角結膜炎

方 法

1 定点把握疾病の過去5年間の同時期との発生状況の比較

米国疾病予防対策センター(CDC)の週報に採用している手法を、国立感染症研究所感染症情報センターがわが国のサーベイランス用に改変した方法¹⁾²⁾³⁾を用いて統計処理を行った。祝日の移動などによるデータのばらつきを補正し、過去データと2009年のデータを比較することを目的に、当該週の過去5年間の平均値(過去5年間の前週、当該週、後週の合計15週の平均)と標準偏差(SD)を算出した。データの分布が正規分布に従うとことを前提すると1SDは過去のデータの68%範囲内、2SDは95%範囲内に入る。そこで1SD及び2SDを示すグラフを作成し、2009年における患者報告数と比較し流行状況を検討した。定点当たり患者報告数がこの2SDより多い(若しくは少ない)場合には患者報告数が統計学的に例年より有意に多い(若しくは少ない)といえる。

2 インフルエンザ罹患数推計

国立感染症研究所感染症情報センターが全国罹患数推計に用いている方法⁴⁾に準じて、愛知県のインフルエンザ罹患数推計を週別及び年齢層別に行った。

I 罹患数推計の基礎データ(表2)

(1) 定点情報(定点別)

表2 罹患数推計の概要

対象疾病	インフルエンザ
対象期間及び区分	2009年(1～53週)の年間・週別、年齢階級別推計値と95%信頼区間
対象データ	定点情報(定点別) 医療機関コード 医療施設特性* 定点開始・終了年月日 報告数情報(定点別、週別) 医療機関コード 各週における報告の有無 性別・年齢階級別報告数 全医療施設情報(医療施設特性別*) 活動中の医療施設数

*表3参照

表3 医療施設特性別活動中の施設数とインフルエンザ定点医療機関数(愛知県)

インフルエンザ罹患数推計に用いる医療施設特性(層)の区分	活動中の施設数 (2005年)	インフルエンザ定点数 (2009年)
1 病院の小児科	127	44
2 小児科を有する一般診療所(主たる診療科目が小児科)	364	88
3 小児科を有する一般診療所(主たる診療科目が小児科以外)	1,303	60
4 病院の内科または内科を有する一般診療所(小児科を有しない)	1,639	3
計	3,433	195

医療機関匿名化のため医療機関コードを使用した。医療機関特性については表3に示す4区分に層別化しインフルエンザ罹患数を算出する。推計対象期間において定点として機能しているかの特定には定点開始・終了年月日を用いる。

(2) 報告数情報(定点別、週別)

定点別、週別、年齢階級別報告数を用いる。報告数が0の場合は報告あり(報告数0)として扱い、休診等の報告なしと区別する。

(3) 全医療施設情報

2005年の医療施設調査に基づく活動中の医療施設数であり、愛知県の医療施設特性別のデータを表3に示す。

II 罹患数推計方法(表4)

全国罹患数推計は、定点が地域(都道府県)及び医療施設特性(表3)の層ごとに無作為抽出であり、定点からの報告数が多項超幾何分布に従うと仮定して算出している。各都道府県における層ごとの定点当たり報告数と活動中医療施設数の積を合計して全国罹患数推計値としている。愛知県罹患数もこの推計方法を用い、各層の定点当たり報告数と活動中医療施設数の積を合計して推計値とした。

結 果

1 過去5年間の同時期との流行状況の比較(図1)

表1に示す14疾病について過去5年間の同時期の定点当たりの報告数及び2009年の定点当たり報告数の比較グラフを図1に示す。RSウイルス感染症については迅速診断キットが普及途上にあるので、過去データとの比較は留意が必要である。

ヘルパンギーナは例年に比べ流行ピーク週が少し遅れたが流行レベルは例年なみで

あった。A群溶血性レンサ球菌咽頭炎及び水痘は年末にかけて例年を下回ったが流行シーズン中は過去5年間と同程度の流行であり、咽頭結膜熱及び手足口病は1年を通して過去5年間平均を下回るレベルで推移した。感染性胃腸炎は過去連続して観察された年末にかけての流行が2009年にはみられなかった。

インフルエンザは、2009年31週以降は新型インフルエンザ(A/H1N1)を含めた報告であり例年の流行とは時期が大きく異なった。流行期の違いはあるが新型インフルエンザ第1波は過去5年間の平均流行レベルを上回ったものの2SD範囲内の流行レベルであったことが伺える。急性出血性結膜炎については年間を通じて報告数が少なく週ごとの定点報告数は大きく変動していた。

表4 週別の愛知県罹患数推計方法

- i : 定点を表す添字
 - j : 医療機関特性を表す添字 ($j = 1, 2, 3, 4$)
 - v_j : 層jにおける医療施設数
 - N_j : 層jにおける報告あり(報告数0人を含む)の定点数
 - X_{ij} : 層jにおける定点iの報告数($i = 1, 2, \dots, N_j$)
 - M_j : 層jにおける X_{ij} の平均値

$$= \frac{\sum_{(i)} X_{ij}}{N_j} \quad (N_j \geq 1)$$
 - S_j : 層jにおける X_{ij} の標準偏差

$$= \sqrt{\frac{\sum_{(i)} (X_{ij} - M_j)^2}{N_j - 1}} \quad (N_j \geq 2)$$
 - α_j : 層jにおける罹患数の推計値 $= v_j \cdot M_j \quad (N_j \geq 0)$
 - σ_j : α_j の標準誤差

$$\begin{cases} = v_j \cdot S_j \cdot \sqrt{\frac{N_j - 1}{N_j} \cdot \frac{v_j}{v_j - 1} \cdot \left(\frac{1}{N_j} - \frac{1}{v_j}\right)} & (N_j \geq 2) \\ = v_j \cdot S_j & (N_j \leq 1) \end{cases}$$
 - $\alpha_{..}$: 愛知県の罹患数推計値 $= \sum_{(j)} \alpha_j$
 - $\sigma_{..}$: $\alpha_{..}$ の標準誤差 $= \sqrt{\sum_{(j)} \sigma_j^2}$
- 罹患数の95%信頼区間: $(\max\{0, \alpha_{..} - 1.96 \sigma_{..}\}, \alpha_{..} + 1.96 \sigma_{..})$

図1 定点把握疾病(14疾病)の2009年における定点当たり患者報告数と過去5年間(2004~2008年)の同時期との比較(愛知県、診断週別) [その1]

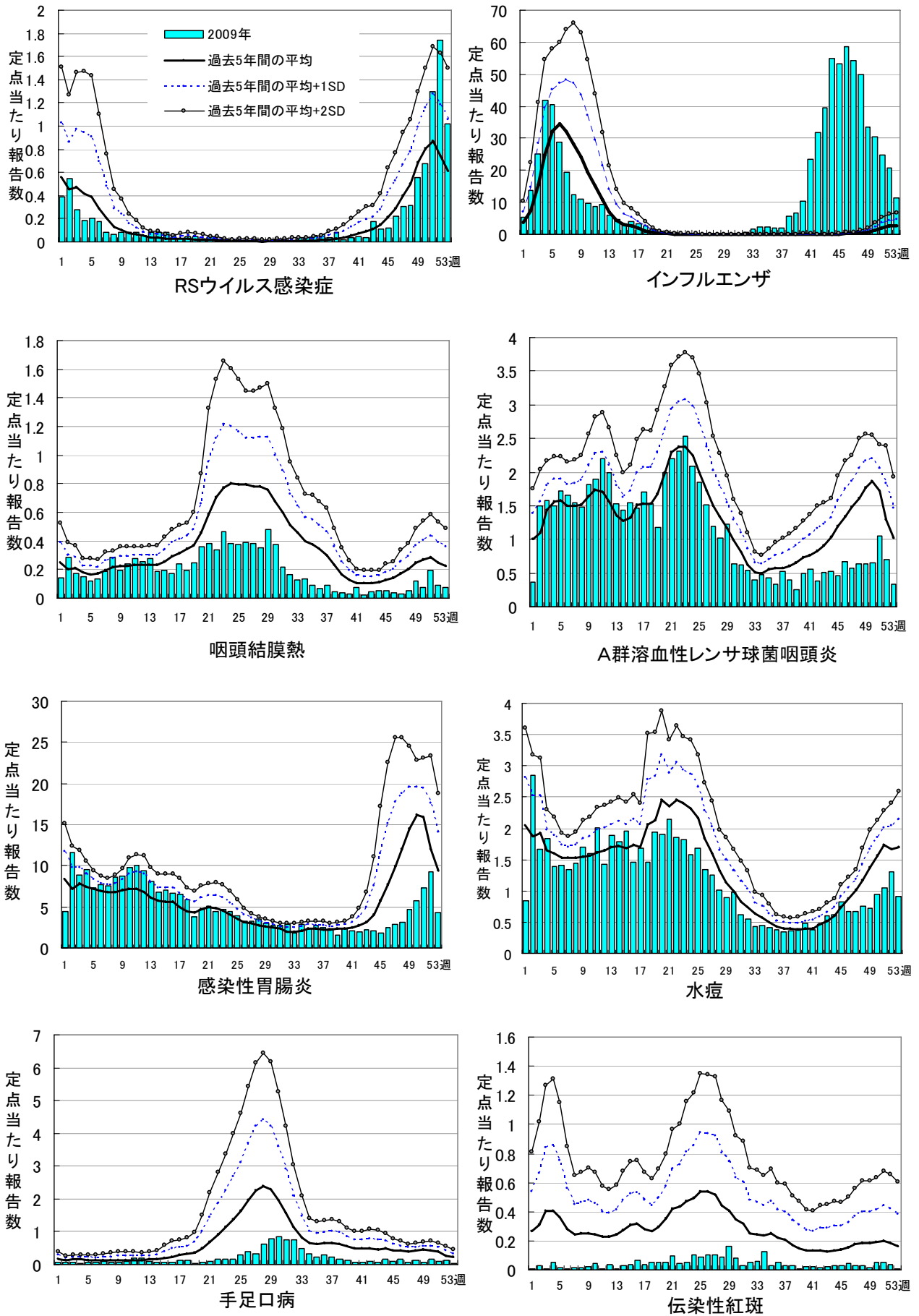
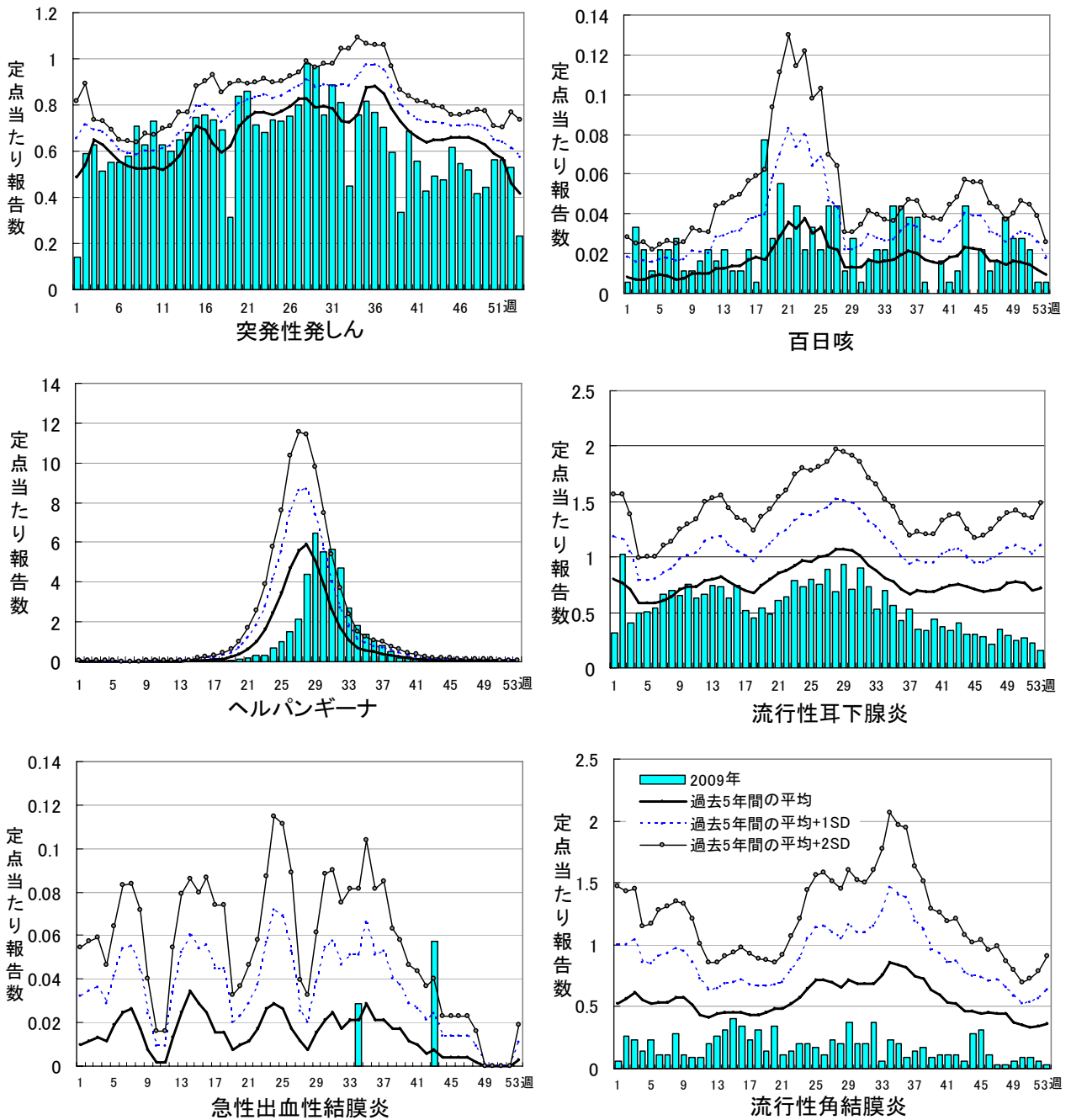


図1 定点把握疾病(14疾病)の2009年における定点当たり患者報告数と過去5年間(2004~2008年)の同時期との比較(愛知県、診断週別) [その2]



2 2009年におけるインフルエンザ罹患数推計(図2、表5、表6)

2009年及び新型インフルエンザ(A/H1N1)を報告に含めた31週~53週における年齢層別インフルエンザ罹患数推計値を表5及び表6に示す。2009年に愛知県内の医療機関を受診したインフルエンザ罹患患者の推計値は約142万人であった(図2)。愛知県の人口は7,414,098人⁵⁾であり、2009年の1年

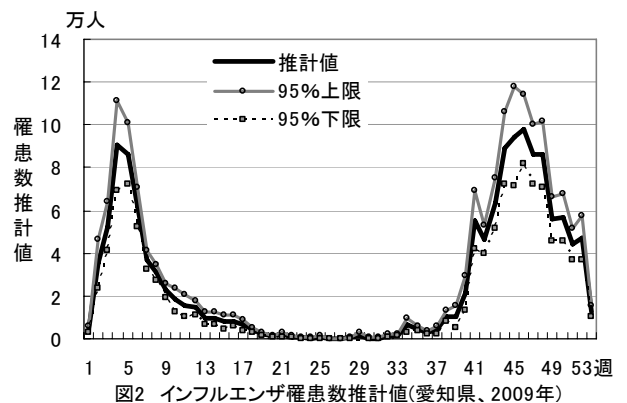


表5 2009年愛知県における年齢層別インフルエンザ罹患数推計値(1～53週)

年齢層	推計値 (1～53週)	95%信頼区間		年齢層別人口 (愛知県)*	年齢層別 罹患数割合(%)
		下限	上限		
0歳	9,930	8,480	11,400	70,098	14.2
1歳	25,700	22,000	29,400	72,735	35.3
2歳	29,700	25,100	34,300	71,583	41.5
3歳	40,200	34,800	45,600	70,354	57.1
4歳	56,900	49,100	64,800	69,371	82.0
5歳	69,300	59,800	78,800	69,904	99.1
6歳	69,500	59,900	79,200	70,459	98.6
7歳	68,100	57,100	79,100	72,065	94.5
8歳	72,300	60,600	84,000	73,182	98.8
9歳	70,300	56,200	84,500	74,296	94.6
10～14歳	300,000	255,000	345,000	364,149	82.4
15～19歳	146,000	126,000	166,000	356,379	41.0
20～29歳	151,000	124,000	178,000	917,410	16.5
30～39歳	136,000	107,000	166,000	1,157,869	11.7
40～49歳	91,300	73,600	109,000	984,018	9.3
50～59歳	48,700	35,300	62,100	893,601	5.4
60～69歳	22,400	14,600	30,100	1,000,223	2.2
70～79歳	12,700	5,860	19,600	644,201	2.0
80歳以上	1,740	800	2,670	346,648	0.5
総計	1,421,770	1,250,000	1,590,000	7,378,545	19.3

*年齢不詳35,553人を除く

間では、5.3人に1人がインフルエンザで医療機関を受診したと推計され、全国の推計値3,067万人/人口1億2,747万人⁶⁾の4.2人に1人より低い値となった。

年齢層別にみると、5歳～9歳の各年齢層では年齢層別人口に対する推計罹患割合が95～99%に達し、この年齢層の多くが2009年中にインフルエンザで医療機関を受診したと推定される。

2009年31週以降のインフルエンザ報告はほとんど新型インフルエンザA/H1N1と推測される。愛知県の2009/2010年シーズンインフルエンザウイルス検出状況によれば、AH1pdmのみが検出されている⁷⁾ことから、31～53週の報告はすべて新型インフルエンザの報告と仮定すると、新型インフルエンザの推計罹患患者数は約90万人であり、計算上同期間に愛知県民の8.2人に1人が新型インフルエンザと診断されたことになる。全国の31～53週の罹患数推計は1,810万人(2010年1月8日現在暫定値)であり7.0人に1人が新型インフルエンザと診断されたと推定され、愛知県の新型インフルエンザ推計罹患患者数は全国レベルより低かった。

考 察

サーベイランスにおいては疾病の発生と蔓延に関する状況を継続的に監視すると同時に、有効な対策をとるには迅速に情報発信しなければならないが、過去5年間の同時期との比較はそのための有用な基礎資料となる。今回の成果を活用し、現在の感染症の発生状況の過去との比較をわかりやすいグラフとしてWebサイトなどを通して提供するシステムを構築する予定である。

2009年のインフルエンザ罹患数推計総計及び新型インフルエンザ罹患数推計値のいずれも、愛知県は全国レベルより低値となった。罹患数推計は流行規模の把握を可能とし、今後の医療体制やワクチン供給計画策定などに有用な情報になり得ると考えられる。

従来から速やかに還元している定点当たり患者報告数は、インフルエンザ発生状況の推移や注意報・警報発令の判断に有用である。これとあわせて愛知県全体の罹患数推計値を提供することにより、愛知県のインフルエンザ発生状況の全体像の把握が可能になると考えられる。今後、愛知県の実状に合わせた推計法の改良が求められる

表6 2009年愛知県における年齢層別インフルエンザ罹患数推計値(31～53週)

年齢層	罹患数推計値 (31～53週)	95%信頼区間		年齢層別人口 (愛知県)*	年齢層別 罹患数割合(%)
		下限	上限		
0歳	5,000	4,200	5,800	70,098	7.1
1歳	13,100	11,100	15,000	72,735	18.0
2歳	17,800	14,300	21,300	71,583	24.9
3歳	23,900	20,400	27,300	70,354	34.0
4歳	34,900	29,600	40,200	69,371	50.3
5歳	44,900	38,500	51,300	69,904	64.2
6歳	44,100	37,800	50,300	70,459	62.6
7歳	47,000	39,400	54,600	72,065	65.2
8歳	53,300	43,400	63,200	73,182	72.8
9歳	52,100	40,100	64,200	74,296	70.1
10～14歳	227,000	191,000	263,000	364,149	62.3
15～19歳	119,000	100,000	138,000	356,379	33.4
20～29歳	90,500	68,300	113,000	917,410	9.9
30～39歳	59,400	47,000	71,800	1,157,869	5.1
40～49歳	41,400	34,000	48,800	984,018	4.2
50～59歳	17,700	14,200	21,100	893,601	2.0
60～69歳	4,300	3,700	4,800	1,000,223	0.4
70～79歳	3,400	1,100	5,700	644,201	0.5
80歳以上	400	180	670	346,648	0.1
合計	899,000	773,000	1,020,000	7,378,545	12.2

*年齢不詳35,553人を除く

が、感染症発生動向調査の定点選定に関しては、全国的に受診者数の多い医療機関が定点として選定される傾向があると考えられており⁴⁾、愛知県もこの可能性を考慮しなければならない。今後より精度の高い推計を行うためには、無作為抽出の徹底、定点数の増加の可能性を検討する必要がある。特に「病院の内科または内科を有する一般診療所(小児科を有しない)」に属するインフルエンザ定点は現在3か所しかなく、定点報告数の動きは罹患数推計値への影響が大きいと、精度向上にはこの層の定点の充実が望ましい。

今後も感染症発生動向調査データの活用をめざした調査研究を推進したい。

文 献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター：読者のコーナー，IDWR2000年第2週(1月10日～16日)。
- 2) 長谷川伸作：感染症発生動向調査情報の

迅速還元と流行予測，情報処理学会論文誌 データベース，40，132-140，1999。

- 3) Donna F, et al: Evaluation of a Method for Detecting Aberrations in Public Health Surveillance Data, Am J Epidemiol, 137, 373-380, 1993.
- 4) 永井正規：感染症発生動向調査に基づく流行の警報・注意報および全国年間罹患数の推計—その9—。「疫学的・統計学的なサーベイランスの評価と改善グループ」研究報告書，29-75，2009。
- 5) 愛知県県民生活部統計課：愛知県人口動向調査結果(年速報，2009年12月24日)統計表第3表。
- 6) 総務省統計局：人口推計月報 年齢(5歳階級)，男女別推計人口。平成22年1月1日現在(概算値)。
- 7) 愛知県衛生研究所：2008/09・2009/10シーズンインフルエンザウイルス分離・検出状況(2009年12月31日現在)，http://www.pref.aichi.jp/eiseiken/67f/infbunri08_09.htm。

Features of infectious disease surveillance system in Aichi Prefecture

- Epidemics of infectious diseases and estimation of influenza incidence in 2009 -

Masako Tsuzuki, Masayuki Takeshima, Kaoru Hirose, Takeshi Hanji, Hiroko Minagawa

In April 1999, the Law Concerning the Prevention of Infectious Diseases and Medical Care for Patients of Infections enacted, and infectious disease surveillance was designated as one of the important components for disease control. Sentinel surveillance was incorporated as the national epidemiological surveillance for infectious disease (NESID) in combination with national notifiable diseases. In order to strengthen the surveillance system based on analysis of the incidence and the trend of infectious diseases, effective and timely feedback of such information to the general public as well as those working in medical fields are proposed.

The data in the period from 2004 to 2009 on surveillance system in Aichi Prefecture were collected and analyzed. We applied the method provided by National Institute of Infectious Diseases to compare reported rates with the average from the 15 weeks observed during previous 5 years including each and antero-posterior weeks and presented a general view of epidemics of 14 infectious diseases in 2009 in Aichi Prefecture.

The method for estimating incidence of influenza based on the weekly and age-specific reported numbers of cases from the sentinel medical institutions in the NESID was reported. The incidence of influenza in Aichi Prefecture in 2009 was approximately 1.42 million. Some of the limitations and problems in the present study are as follows: the estimation of the accuracy of the data, the critical assumption in the method that sentinels are randomly selected from all medical institutions. The sentinels are tend to be recruited on a voluntary basis and the mean size of the underlying population are generally overbalanced in sentinels in proportion to all medical institution, therefore, the incidence would inevitably be overestimated.

Furthermore, we attempt to provide the public and medical professionals with the essential information to prevent infectious diseases based upon the surveillance data.

Key words : surveillance of infectious diseases, sentinel-based surveillance, influenza, estimation of incidence

調 査 研 究

食品からのカンピロバクター菌検出法の開発

平松礼司 青木日出美 下岸 協 遠山明人 皆川洋子

要 旨

食品からのカンピロバクター菌検出法開発のために、様々な培養条件を検討した。まず当所に保存している患者由来菌株の純培養菌液を用いて検討したところ、増菌培地ではプレストン培地よりボルトン培地、分離培地では CCDA 培地よりスキロー培地の方が、また分離培地への増菌培養液塗抹量は多い(100 μ l)の方が検出率が高かった。次に実際の市販鶏肉からの検出では、保存菌株とは対照的に増菌培地ではボルトン培地よりプレストン培地、分離培地ではスキロー培地より CCDA 培地の方が検出率が高く、増菌培養液塗抹量は少ない(10 μ l)の方が菌の遊走が少なくコロニーの分離が容易であった。さらに、検体 25 g に対して加える増菌培地量 225ml(10 倍液)と 100ml(5 倍液)との比較では、検出率はほぼ変わらないことから 100ml を使用した方が経済的、空間的にも良好であり、また、英国の PHLS (Public Health Laboratory Service) 法において認められている「シール培養法(通気性のない容器に空隙部分を残さない状態で、そのまま好気培養する方法)」は、通常 of 微好気培養法と比較し定量的検出感度は僅かに劣るものの、容器ごと微好気状態にする必要がなく好気状態のまま培養できる簡便さからルーティンの食品検査の定性試験には応用可能であると考えられた。なお、遺伝子検査法の 1 つの LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法も実施したが、通常 of 培養法と検出感度が同等であることが判明し、増菌培養後約 2 時間で結果判定が可能であることからスクリーニング検査として有効であると考えられた。

キーワード：カンピロバクター菌検出法、微好気培養法、シール培養法、LAMP 法

序 文

カンピロバクター菌はらせん状形態の鞭毛を持つグラム陰性無芽胞性菌で、古くからウシやヒツジなどの家畜で流産や腸炎を起こす菌として注目されていた。1970 年代に入りヒトにも腸炎を起こすことが判明し、我が国においても 1982 年に食品衛生法施行規則の一部改正により、厚生省(現厚生労働省)に報告する食中毒事件票の「病因物質の種別」欄に、食中毒起因菌として新たに追加された。

近年我が国におけるカンピロバクター菌による食中毒は増加傾向にあり、年間事件

数では第 1 位を占めている。患者数においても 3,000 名(平成 20 年 3,071 名)を超え、欧米諸国と同様に我が国でも主要な食中毒原因菌となった¹⁾。カンピロバクター食中毒の主な原因食品は、欧米諸国が生牛乳であるのとは異なり、我が国では鶏肉、牛レバーを中心とした肉類と考えられているが、実際の残品食品からカンピロバクター菌が検出される事例は比較的稀である。食品から検出困難な原因として、1)食品中の汚染菌量が比較的少なくても発症すること、2)食中毒原因菌のなかでは潜伏期間が長く(2-7 日)、検査開始前に冷凍もしくは冷蔵保

存された食品中の菌が損傷状態にあること、等が考えられる。このため、より検出感度の高い検査方法の開発が、食中毒原因菌の検出のみならず発症菌量の算定、市販食品の正確な汚染実態を知るうえでも求められている。

食品からのカンピロバクター菌検出法は、我が国では食品衛生検査指針、海外ではPHLS法(英国)、FDA-BAM法(米国)、及びISO法等により提示されているが、各法ごとに試料調製法、微好気状態にする手法、培地の種類及び培養温度等が異なっている²⁾。さらにカンピロバクター菌は、大腸菌やサルモネラ菌等腸内細菌科に属する他の食中毒原因菌とは異なり、大気中では発育せず微好気条件を求めるという特徴がある。このため従来検査法では特殊な装置を必要とするが、一般に食中毒原因菌の検査を行う施設において、複数の培養条件を要する複雑な検査法を日常的に実施するのは実際的でない。

そこで各検査法で提示されている様々な条件を組み合わせ、最も高感度で且つ簡易な検出方法の確立をめざす。さらに冷蔵や冷凍保存により損傷を受けたカンピロバクター菌についての検出感度も検討する。

方 法

1 供試菌株

愛知県内 A 病院で分離された患者由来 *Campylobacter jejuni* 1 株を用いた。

凍結保存菌株を融解後スキロー培地にて数代継代して栄養状態に戻した後に 2 日培養した菌を、生理食塩水に約 McFarland 1 の濃度に懸濁し、菌原液 (3.6×10^6 /ml) とした。

2 使用培地

増菌培地としてボルトン(Boltone)培地(OXOID社製)及びプレストン(Preston)培地(OXOID社製)、分離培地としてスキロー(Skirrow)培地(OXOID社製)及びCCDA(Charcoal-Cefoperazone-Deoxycholate Agar)培地(OXOID社製)を使用した。

3 鶏肉

N 市内で購入した市販鶏肉を検体とした。

4 微好気培養法及びシール培養法

微好気培養法は、嫌気ジャー(BBL社製 Gas Pak Jar)及びガスパック(Merck社製 Anaerocult C)を使用した。また、シール培養法には国立医薬品食品衛生研究所より配布されたラミネート製の特殊なストマッカー袋を用い、検体処理後空隙部分が残らないようシールして、通常のインキュベーター内で培養した^{2) 3)}。

5 LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification)法

1 晩増菌した培養菌液を栄研化学の解説書に従ってカンピロバクター検出試薬キット LMP721(栄研化学)で処理後、Loopamp 濁度測定装置 RT-160C(栄研化学)にてカンピロバクター遺伝子の有無を測定した。

6 カンピロバクター菌の同定

鏡検による運動性及び形態の確認並びにラテックス凝集試験(カンピロバクターLA「生研」)での凝集を確認後、グラム染色、チトクローム・オキシダーゼ試験、カタラーゼ試験及び馬尿酸塩試験を行いカンピロバクター菌と同定した。鶏肉からの分離株については、さらに全国地方衛生研究所協議会カンピロバクター・レファレンス委員会より配布された血清を用いてLiorの血清型試験を行った⁴⁾。

結 果

実験 1 保存菌株を用いた実験

患者由来菌原液 (3.6×10^6 /ml) を生理食塩水にて $10^4 \sim 10^7$ 倍に段階希釈した菌液 1ml をボルトン培地及びプレストン培地各々 100ml に接種した。42°C、24 時間増菌培養後に、増菌培養液 $10 \mu\text{l}$ 及び $100 \mu\text{l}$ をスキロー培地及びCCDA培地に塗抹し 42°C、48 時間培養後、菌の検出を試みた。

その結果は表 1 に示すとおり、ボルトン培地では 10^7 倍まで両分離培地とも塗抹量に関わらず全て検出されたが、増菌にプレストン培地を用いた場合 10^7 倍でスキロー培地では $10 \mu\text{l}$ 、CCDA培地では両塗抹量ともに検出されなかった。以上のことからカンピロバクター菌液からの分離には増菌培地ではボルトン培地、分離培地ではスキロー培地が、塗抹量は $10 \mu\text{l}$ より $100 \mu\text{l}$ の方

が検出感度が高かった。

また、シール培養法も行い CCDA 培地 10 μ l 塗抹時についてのみ、通常のガスパックを用いた微好気培養と検出感度の差を比較した。その結果、表 2 に示すとおり両増菌培地ともシール培養法では通常の微好気培養法より検出感度が 1/10(1 段階)であった。

実験 2 鶏肉からの検出条件 1

市販の鶏肉 5 件(もも、むね、ササミ、鶏皮、手羽先)を購入し、以下のような条件でカンピロバクター菌の検出を試みた。各検体 10 g をボルトン培地及びプレストン培地各々 90ml に添加し、1 分間のストマッカー処理を行った。42℃、24 時間増菌培養した後、増菌培養液 10 μ l 及び 100 μ l をスキロー培地及び CCDA 培地に塗抹し 42℃、48 時間培養後、菌の検出を試みた。

その結果、ボルトン培地では全 5 検体とも両分離培地で全て緑膿菌、酵母等の雑菌が遊走状態に発育し、再分離を実施してもカンピロバクター菌を分離・検出することはできなかった。一方、プレストン培地を用いた場合、表 3 に示したように CCDA 培地に塗抹したササミ検体より検出された。塗抹量 10 μ l 及び 100 μ l ともに分離されたが、10 μ l の方が菌の遊走が少なくコロニーの分離が良好であり再分離の必要もなかった。検出されたカンピロバクター菌の菌種は *Campylobacter jejuni* で Lior 血清型は TCK13 であった。なお、スキロー培地においてもカンピロバクターを疑う菌の発育は認められたが、分離には至らなかった。

Campylobacter jejuni を検出したササミをさらに 7 日間冷蔵及び冷凍保存後、各 10g をプレストン及びボルトン両増菌培地各 90ml に添加し、1 分間のストマッカー処理を行い 42℃、24 時間増菌培養した。その増菌培養液 10 μ l をスキロー培地及び CCDA 培地に塗抹し 42℃、48 時間培養後、菌の検出を試みた結果、冷凍保存の検体でボルトン培地及びスキロー培地の組み合わせの時のみ *Campylobacter jejuni* を検出した。なお、冷蔵保存検体からはどの組み合わせからも検出されなかった。

実験 3 鶏肉からの検出条件 2

冷蔵状態で販売されている鶏皮付きもも肉 10 検体を皮と肉に分離して計 20 試料とした。各々 25g をプレストン培地 100ml 及び 225ml に加えストマッカー処理を行い 5 倍液及び 10 倍液とし、シール培養法及び通常の微好気培養法で 10ml, 1ml, 0.1ml の 3 管法による最確数(MPN)定量試験を実施した。その結果、定量試験において 20 試料中 12 試料からカンピロバクター菌が検出され、微好気培養法の方がシール培養法より定量値が高かったのが 15 回、同等であったのが 4 回、及びシール培養法の方が微好気培養法より定量値が高かったのが 5 回であった(表 4)。シール培養法は、菌液を用いた実験と同様に微好気培養法より検出感度はやや低いものと考えられる。また、プレストン培地量 100ml(5 倍液)と 225ml(10 倍液)を比較すると、MPN 値は試料及び培養法により一定ではなかったが、検出限界未満であったのは 100ml を使用した時の方が少なかった。

市販鶏肉 10 検体中 6 検体から検出されたカンピロバクター菌は全て *C. jejuni* で Lior の血清型は Lior4 が 3 検体、TCK26 が 2 検体、及び型別不能株が 1 検体であった。

実験 4 鶏肉からの検出条件 3

市販の鶏肉 5 件(もも、むね、ササミ、鶏皮、手羽先)を購入し、各検体 25 g をボルトン培地及びプレストン培地各々 100ml に添加、分離培地には CCDA 培地を使用し、他の培養条件等は実験 2 と同様に実施したが、プレストン培地の増菌培養のみシール培養も行った。また、今回は培養法と LAMP 法の検出感度を比較するために、1 晩培養の増菌培養液を用いて LAMP 法も実施した。結果は表 5 に示したとおり、検体及び増菌培地の種類に関係なく LAMP 法は培養法と検出感度は同等であった。また、微好気培養でプレストン培地を用いると 5 検体から全て検出されたが、ボルトン培地を用いると 1 検体からしか検出されず、対照的にプレストン培地を用いたシール培養法では 4 検体から検出された。

表 1 カンピロバクター菌の使用培地等による検出感度の相違

増菌培地	分離培地	塗抹量	培養菌液の希釈倍数 ($3.6 \times 10^6 / \text{ml}$)			
			10^4	10^5	10^6	10^7
ボルトン培地	スキロー培地	$10 \mu\text{l}$	検出	検出	検出	検出
プレストン培地	スキロー培地	$10 \mu\text{l}$	検出	検出	検出	不検出
ボルトン培地	スキロー培地	$100 \mu\text{l}$	検出	検出	検出	検出
プレストン培地	スキロー培地	$100 \mu\text{l}$	検出	検出	検出	検出
ボルトン培地	CCDA 培地	$10 \mu\text{l}$	検出	検出	検出	検出
プレストン培地	CCDA 培地	$10 \mu\text{l}$	検出	検出	検出	不検出
ボルトン培地	CCDA 培地	$100 \mu\text{l}$	検出	検出	検出	検出
プレストン培地	CCDA 培地	$100 \mu\text{l}$	検出	検出	検出	不検出

表 2 微好気培養法(ガスパック)と好気培養法(シール培養)との検出感度の比較

培養方法	増菌培地	分離培地	塗抹量	培養菌液の希釈倍数 ($3.6 \times 10^6 / \text{ml}$)			
				10^4	10^5	10^6	10^7
微好気培養法 (ガスパック)	ボルトン培地	CCDA 培地	$10 \mu\text{l}$	検出	検出	検出	検出
	プレストン培地	CCDA 培地	$10 \mu\text{l}$	検出	検出	検出	不検出
好気培養法 (シール培養)	ボルトン培地	CCDA 培地	$10 \mu\text{l}$	検出	検出	検出	不検出
	プレストン培地	CCDA 培地	$10 \mu\text{l}$	検出	検出	不検出	不検出

表 3 プレストン培地における鶏肉からのカンピロバクター菌検出

鶏肉の種類	塗抹量	CCDA 培地	スキロー培地
もも	$10 \mu\text{l}$	不検出	不検出
	$100 \mu\text{l}$	不検出	不検出
むね	$10 \mu\text{l}$	不検出	不検出
	$100 \mu\text{l}$	不検出	不検出
ササミ	$10 \mu\text{l}$	検出	不検出
	$100 \mu\text{l}$	検出	不検出
鶏皮	$10 \mu\text{l}$	不検出	不検出
	$100 \mu\text{l}$	不検出	不検出
手羽先	$10 \mu\text{l}$	不検出	不検出
	$100 \mu\text{l}$	不検出	不検出

考 察

食品からのカンピロバクター菌検出法開発を目的として、至適条件を探るために様々な条件での培養を試みた。

純培養菌液からの検出では、増菌：ボルトン培地→分離：スキロー培地の組み合わせがより選択性の高いプレストン培地→CCDA 培地の組み合わせと比較して検出率が高く、また分離培地への増菌培養液の塗抹量も $10 \mu\text{l}$ より $100 \mu\text{l}$ の方が検出率が高かった。冷蔵、冷凍保存後の菌液についてもプレストン培地よりボルトン培地の方が検出感度が高かった (data not shown)。

一方、鶏肉からの検出では、菌液からの検出とは異なり選択性の高いプレストン培地→CCDA 培地の組み合わせの方が検出率

が高く、また塗抹量も $100 \mu\text{l}$ より $10 \mu\text{l}$ の方がコロニーの分離が容易であった。ただし、カンピロバクター菌陽性ササミ検体を 7 日間冷凍保存した検体ではボルトン培地→スキロー培地の組み合わせでのみカンピロバクター菌を検出した。

これらの結果から、実際の鶏肉からの検出には選択性の高い培地が適切であることが判明した。鶏肉にはカンピロバクター菌以外の微好気発育菌が多数存在することから、選択性の高い培地を用いて検出可能になるものと考えられた。しかしながら一定期間冷凍され、菌の大部分が死滅していると考えられる検体の場合は、選択性の弱い培地の方が低温による損傷を受けたカンピロバクター菌検出に適切と推測される⁵⁾。

表 4 シール培養及び微好気培養定量試験の MPN 値の比較

検体 No.	プレストン培地 100ml		プレストン培地 225ml	
	シール培養	微好気培養	シール培養	微好気培養
1	検出限界未満	4.6	3.6	検出限界未満
2	検出限界未満	10.5	3.6	3.6
3	3.7	7.5	検出限界未満	3.6
4	7.5	10.5	検出限界未満	3.0
5	検出限界未満	7.5	検出限界未満	9.2
6	10.5	1.5	43	43
7	7.5	14.5	29	240
8	4.6	検出限界未満	3.0	検出限界未満
9	1.8	1.8	検出限界未満	3.6
10	3.7	10.5	3.6	7.4
11	7.5	3.7	3.6	7.4
12	検出限界未満	1.8	検出限界未満	検出限界未満

MPN 値の比較		検査回数
シール培養法 > 微好気培養法		5
シール培養法 < 微好気培養法		15
シール培養法 = 微好気培養法		4

表 5 各培養法及び LAMP 法における検出状況

増菌培地	培養法	No. 1(もも)		No. 2(むね)		No. 3(ササミ)		No. 4(鶏皮)		No. 5(手羽先)	
		培養	LAMP	培養	LAMP	培養	LAMP	培養	LAMP	培養	LAMP
プレストン	微好気	検出	検出	検出	検出	検出	検出	検出	検出	検出	検出
ボルトン	微好気	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	検出	検出
プレストン	シール	不検出	不検出	検出	検出	検出	検出	検出	検出	検出	検出

次にシール培養法と微好気培養法との検出感度の比較を行った。菌液での実験ではシール培養法は微好気培養法に比べ検出感度が 1/10 であり、鶏肉からの検出でもシール培養法は微好気培養法より定量試験では最確数が低いことが判明した。しかしながら、実験 4 においてプレストン培地を用いたシール培養は微好気培養と比較し僅か 1 検体のみ不検出で、ボルトン培地の微好気培養より遙かに検出が良好であったことを考慮すると、その簡便性、経済性等の観点からもルーティン検査に応用できるものと考えられる。以上の結果からシール培養法と増菌培地 100ml (5 倍液) の組み合わせは、嫌気ジャー及びガスパックが不要で、培地量も少なくすむ(インキュベーター容量にも余裕ができる)ため、どのような検査施設でも、より多くの検体をより容易に検査可能にするものと考えられる。

また、遺伝子検査法の LAMP 法は培養法と検出感度が同等であり、培養法では数日かかる検査が数時間で検査可能となるため、今後はスクリーニング検査として有効であ

ると考えられた⁶⁾。

文 献

- 1) 厚生労働省:食中毒統計, 食品衛生研究, 59, 74-160, 2009.
- 2) 久保亮一:カンピロバクター/サルモネラ検査法の国際規格, 食品と開発, 43, 14-17, 2008.
- 3) F. J. Bolton: Campylobacter Infections: Food-borne and Isolation Methods (Special Lecture), 日本食品微生物学会雑誌, 24, 151-156, 2007.
- 4) 大橋 誠, 伊藤 武, 他: Campylobacter jejuni/coli の血清型別に関する研究, 感染症誌, 62, 818-825, 1988.
- 5) 小野一晃, 安藤陽子, 他: 二段階増菌による輸入鶏肉からのカンピロバクター分離法の検討, 日本食品微生物学雑誌, 24, 130-133, 2007.
- 6) 古畑勝則, 柿本将平, 他: LAMP 法および培養法による市販鶏肉からのカンピロバクターの検出比較, 日本食品微生物学雑誌, 23, 237-241, 2006.

Studies on advanced methods for detecting *Campylobacter* spp. in food samples

Reiji Hiramatsu, Hidemi Aoki, Kyou Shimogishi, Akito Tohyama, Hiroko Minagawa

We investigated isolation methods of *Campylobacter* spp. from food samples by evaluating various culture conditions. A *Campylobacter jejuni* strain from a sporadic case grew better using by a combination of Bolton enrichment broth and Skirrow isolation agar than that of Preston broth and m-CCDA. The Detection rate was also higher when 100µl of enrichment culture media was spread and incubated on isolation media than when 10µl was spread and incubated. In contrast to the results of pure culture described above, the detection rate from retail chicken samples was higher with using Preston broth, m-CCDA, and inoculation of 10µl. No significant difference of detection rate was found between 100ml and 250ml of enrichment broth, to which 25g of sample was added. Although the detection rate was a little lower using non-headspace culture method that was accepted in PHLS (Public Health Laboratory Service in England) protocols, compared with a normal microaerobic culture method, the non-headspace method was considered to be very useful for a routine test of detecting *Campylobacter* spp. from food samples, because the non-headspace culture was an easy incubation method that a stomacher bag was filled with enrichment culture suspension homogenized by using a stomacher, then sealed leaving a very little headspace and kept in an aerobic condition. LAMP method, which was a kind of gene detection methods, showed the same results compared as those by the culture method. It thus appears that the LAMP is a very useful test method with convenience and rapidity for detecting food contamination by *Campylobacter*.

Key words: *Campylobacter* isolation method, microaerobic culture, non-headspace culture, LAMP

調査研究

ブロス NPD 方式ガスクロマトグラフィーによる 食品中の多成分残留農薬分析法の検討

上野英二 大野春香 棚橋高志 大島晴美 三上栄一

要 旨

シングルインジェクション、デュアルカラムおよびブロス NPD 方式ガスクロマトグラフィー（デュアルカラム GC-ブロス NPD）による食品中の多成分残留農薬分析法を考案し、日常の残留分析への適用性について検討した。試料からアセトニトリル抽出・水層分離法、次いで酢酸エチル再溶解・脱水法により粗抽出液を得たのち、GPC の選別分画およびグラファイトカーボン SPE、次いでシリカゲル/PSA カートリッジ連結 SPE により精製して、デュアルカラム GC-ブロス NPD で測定した。代表的な 35 種類の有機リン系農薬および 34 種類の含窒素農薬を用いて検証したところ、10 回繰り返し測定における保持時間とピーク面積の相対標準偏差は、それぞれ 0.01~0.07%（平均 0.01%）、0.7~3.8%（平均 1.2%）、検量線の直線範囲は 3 オーダー以上（ $r^2 \geq 0.993$ ）、検出限界は有機リン系農薬で 0.06~0.4 ng/g、含窒素農薬で 0.6~5 ng/g であった。また、ホウレンソウからの添加回収率は、クロロタロニルおよびアクリナトリンを除いて 70.3~105.0%（相対標準偏差<8.1%）と良好であった。

キーワード：残留農薬、食品、デュアルカラム、ガスクロマトグラフィー、ブロス NPD

序 文

食品に残留する農薬等のポジティブリスト制度（平成 18 年 5 月 29 日施行）の導入に伴い、ガスクロマトグラフィー/質量分析法（gas chromatography / mass spectrometry, GC/MS）による食品中残留農薬の多成分分析法^{1~3)}が普及してきている。しかし、GC/MS は夾雑物の影響により農薬成分のイオン化効率が変動する場合があるなど定量性の点で問題も指摘されている⁴⁾。このため選択性では劣るが、比較的安価で、かつ装置のメンテナンスやデータ解析の容易さもあって、リンおよび窒素化合物に特異的な感度を有する高感度窒素リン検出器（nitrogen phosphorus detector, NPD）を装備した GC の利用価値は、試料調製法および GC システ

ムの構成次第では今後も高いと考えられた。

そこで今回、GC/MS による多成分分析法を補完するために、シングルインジェクション、デュアルカラムおよびブロス NPD 方式ガスクロマトグラフィー（以下、デュアルカラム GC-ブロス NPD）による多成分分析法を作成して、日常の食品中残留農薬分析への適用性について検討したので、その結果について報告する。

実験方法

1. 試料

試料は愛知県内の小売店で購入した。

2. 試薬および標準品

試薬は和光純薬工業（株）または関東化学（株）の残留農薬試験用、水は脱イオン

水を蒸留したものを用いた。

標準品は和光純薬工業（株）および林純薬工業（株）の残留農薬試験用を用い、原則としてトルエンに溶解して 1 mg/mL 標準原液とした。標準原液を Table 2 に示したように、有機リン系農薬（P1、P2）および含窒素農薬（N1、N2）の 4 グループに分けてアセトンで希釈し、添加回収試験用の混合標準溶液とした。また、アセトン-ヘキサン（1:1）で適宜希釈して検量線作成用の混合標準溶液とした。

グラファイトカーボンカラムは、ガラスリザーバー（Varian 社製、8.5 mL）に、グラファイトカーボン（Supelco 社製 Supelclean ENVI-Carb）-微結晶セルロース（Merck 社製 Avicel）（1:2）0.5 g、次いで無水硫酸ナトリウム 0.5 g を充てんしたものを GPC 装置のコレクションチューブに装着して用いた²⁾。シリカゲル/PSA カートリッジカラムは、Varian 社製 Bond Elut Jr-PSA（500 mg）の手前に Waters 社製 Sep-Pak Plus Silica（690 mg）を連結して用いた²⁾。

3. 装置および条件

GPC 装置：（株）島津製作所製 GPC クリーンナップシステムを用いた。GPC 条件は、既報²⁾ に準じて設定した。

デュアルカラム GC-ブロス NPD 装置：Agilent Technologies 社製 6890GC（オートインジェクター 7683、GC ケミステーション付）に、Restek 社製の不活性スプリットレスライナー（シングルテーパー型）、ガードカラム（内径 0.53 mm、長さ 2 m）および Y コネクター、デュアルカラム① J&W 社製 DB-5ms（内径 0.32 mm、長さ 30 m、膜厚 0.5 μ m）-ブロス NPD、デュアルカラム② J&W 社製 DB-1701P（内径 0.32 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m）-FPD（P モード）を装着して用いた（Fig. 1）。測定条件は、注入口温度 240 $^{\circ}$ C、カラム温度プログラム 60 $^{\circ}$ C（1 min） \rightarrow 10 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 200 $^{\circ}$ C \rightarrow 5 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 280 $^{\circ}$ C（14 min）、キャリアガス He 圧力プログラム 130 kPa（1 min） \rightarrow 2 kPa/min \rightarrow 218 kPa、ブロス NPD（温度 280 $^{\circ}$ C、 H_2 流量 3 mL/min、Air 流量 120 mL/min、メイクアップ He 流量 3 mL/min、Offset 調整 20 pA）、FPD（温度

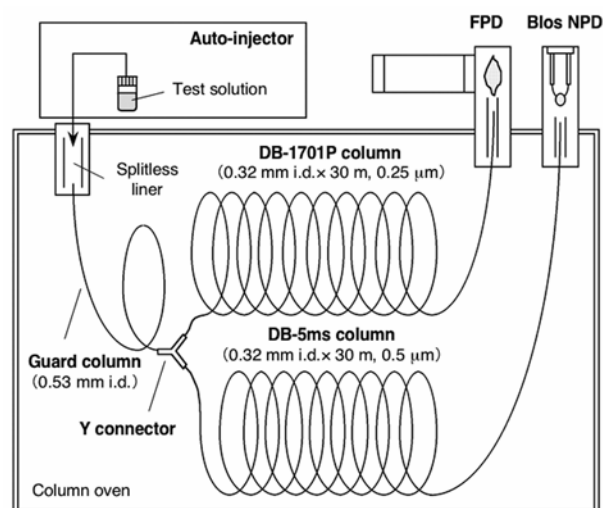


Fig. 1. Dual-column GC – bios NPD

250 $^{\circ}$ C、 H_2 流量 150 mL/min、Air 流量 110 mL/min、メイクアップ N_2 +キャリアガス He 流量 60 mL/min)、注入量 2 μ L、注入モード スプリットレス（1 min）に設定した。

4. 分析操作

（1）試験溶液の調製

細切試料 50 g から既報²⁾ に準じてアセトンニトリル抽出・水層分離法、次いで酢酸エチル再溶解・脱水法により粗抽出液 10 mL（試料濃度 2.5 g/mL）を得た。これを 3000 回転/分で 15 分間遠心分離後、上清 4 mL（試料 10 g 相当）を既報²⁾ に準じて GPC（gel permeation chromatography、ゲル浸透クロマトグラフィー）の選別分画およびグラファイトカーボン SPE（solid-phase extraction、固相抽出）により精製し、さらにシリカゲル/PSA カートリッジ連結 SPE により精製したのち、アセトン-ヘキサン（1:1）で 2 mL に定容して試験溶液（試料濃度 5 g/mL）とした。なお、GPC の分取開始時間を 11.4 min から 11.8 min に変更した。

（2）定性および定量

GC ケミステーションのデータ解析画面上で、ブロス NPD により得られた混合標準溶液と試験溶液のクロマトグラムをそれぞれ並列させ、目視により保持時間およびピーク形状を確認し、必要により手動で波形処理を行ったのち、ピーク面積を用いる絶対検量線法により定量した⁵⁾。

結果および考察

1. デュアルカラム GC-ブロス NPD

今回は、NPD で検出される蓋然性が高いなど代表的な 35 種類の有機リン系農薬および 34 種類の含窒素農薬を選抜した⁶⁾。Fig. 1 に示したように、GC は 1 回の注入による測定で 2 種類のクロマトグラムが得られ、確実な定性および定量を可能とするシングルインジェクション-デュアルカラム方式とした。分離カラムは、GC/MS に汎用される DB-5ms および分離パターンの大きく異なる DB-1701P を採用した (Table 1)⁵⁾。これに、従来のセラミック製ビーズと比較して寿命が長い上に、安定性に優れ、リン化合物の感度と選択性が向上したとされるガラス製ブロスビーズを装着した NPD (ブロス NPD)、およびリン用光学フィルターを装着した炎光光度型検出器 (flame photometric detector、FPD)^{7、8)} をそれぞれ組み合わせた。

試験溶液 2 μ L をスプリットレスで注入し、Y コネクターで 2 種類のカラムに分岐させたときの分配率およびブロス NPD の再現性を検証するために、0.2~1 μ g/mL 混合標準溶液を 10 回連続して測定するデュアルカラム GC-ブロス NPD の性能評価試験を実施し、その結果を Table 1 に示した。保持時間とピーク面積の相対標準偏差 (変動係数) は、それぞれ 0.01~0.07% (平均 0.01%)、0.7~3.8% (平均 1.2%) と再現性は非常に良好であった。また、検量線は有機リン系農薬 1~1,000 ng/g および含窒素農薬 10~10,000 ng/g の範囲で寄与率 (r^2) 0.993~1.000 と 3 オーダー以上の優れた直線性が確認された。検出限界は有機リン系農薬 0.06~0.4 ng/g、含窒素農薬 0.6~5 ng/g であり、ポジティブリスト制度下における一律基準 (0.01 μ g/g) レベルを十分に検出可能であった。従来の GC-NPD⁷⁾ に比較して含窒素農薬では若干の感度上昇に留まったが、有機リン系農薬ではおよそ 5 倍も高感度であった。

2. 試験溶液の調製

本法を日常の残留農薬分析に応用して検証したところ、葉菜類、特にクロロフィ

ル色素を多量に含有するハウレンソウでは、試験溶液にクロロフィル色素による着色が見られることがあった。このため GC 注入部のスプリットレスライナーやガードカラム先端部分へのクロロフィル色素の付着によって感度低下を起しやすしいソキサチオン⁹⁾ のピーク強度が 25 回程度の連続測定で 30% 程度減衰することがあった。そこで、クロロフィル色素をより効率よく除去するために、GPC の分取開始時間をハウレンソウでは 11.4 min (アクリナトリンのピークトップ)²⁾ から 11.8 min (アクリナトリンとフルバリネートのピークトップの中央) へと若干遅らせることにした。この GPC 条件の変更により、ハウレンソウの試験溶液の 25 回連続測定におけるイソキサチオンの減衰率は 15% 以下と大きく改善された。

3. 添加回収試験

ハウレンソウに混合標準溶液 1 mL を添加後、30 分間放置したものについて試験溶液を調製し、デュアルカラム GC-ブロス NPD により測定して回収率を求め、その結果を Table 2 に示した。食品成分の共存下で分解しやすいクロロタロニル¹⁰⁾ および GPC での溶出が早いアクリナトリンを除く農薬成分で 70.3~105.0% の回収率 (相対標準偏差 < 8.1%) が得られ、本分析法の優れた定量性が確認された。

Table 2 に EI (electron ionization、電子イオン化) モード GC/MS により測定し、アセフェート- d_6 など 14 種類のサロゲート物質⁴⁾ を用いる内標準法により定量して得られた回収率を示した²⁾。この方法では、アジンホスメチル、ピラクロホス、ジフェノコナゾールなどで回収率が高くなった。これは、GC 注入部の活性部位で生じるマトリックス効果¹¹⁾ によるピーク強度の上昇が主な原因であり、このような物性を有する適切なサロゲート物質を割り当てられなかったものと考えられた。

GC/MS は真空度が低下することから、GC 注入部でのマトリックス効果を低減するために有効な高圧注入⁸⁾ には限界がある。これに対してデュアルカラム GC-ブロス NPD

Table 1. Retention time, repeatability, linearity, and detection limit of compounds by dual-column GC - blos NPD

Compound	RT, min		Repeatability (n=10)		Linearity ^{a)}			Detection limit ^{b)} , ng/g
	Blos NPD (DB-5ms)	FPD (DB-1701P)	RT, min RSD, %	Area RSD, %	Slope ($\times 10$)	Intercept (/10)	r^2	
Methamidophos	8.882	10.822	0.06	3.4	140	330	0.997	0.4
Dichlorvos	9.127	9.547	0.02	1.2	60	13	0.999	0.2
Acephate	11.775	13.835	0.07	3.1	140	270	0.996	0.4
Fenobucarb	14.012		0.02	0.9	17	2	0.999	0.6
Cadusafos	14.982	14.517	0.02	1.0	230	-21	1.000	0.09
Dimethoate	15.472	17.136	0.02	1.4	190	110	0.997	0.1
Cyanophos	16.059	17.012	0.01	0.9	210	-35	1.000	0.09
Diazinon	16.184	15.592	0.01	1.0	200	60	0.999	0.07
Chlorothalonil	16.343		0.02	0.8	6	-6	0.997	2
Iprobenphos	16.859	16.619	0.01	0.8	210	-14	1.000	0.08
Dichlofenthion	17.232	16.711	0.01	0.8	170	44	1.000	0.09
Chlorpyrifos methyl	17.394	17.024	0.01	1.0	170	26	1.000	0.09
Tolclofos methyl	17.596	17.418	0.01	1.0	190	-3	1.000	0.08
Carbaryl	17.726		0.03	1.8	11	-6	0.999	2
Metalaxyl	17.770		0.01	1.2	4	1	0.999	3
Pirimiphos methyl	18.137	17.645	0.02	1.0	180	42	1.000	0.08
Fenitrothion	18.222	18.892	0.02	1.0	190	34	0.999	0.1
Malathion	18.455	18.705	0.02	1.0	180	35	0.999	0.1
Chlorpyrifos	18.656	18.021	0.02	0.7	160	30	1.000	0.09
Diethofencarb	18.679		0.02	0.8	3	2	1.000	4
Dimethylvinphos	18.712	18.947	0.02	0.7	160	-9	1.000	0.1
Fenthion	18.782	18.673	0.02	0.7	190	-15	1.000	0.1
Parathion	18.879	19.437	0.02	0.9	210	24	1.000	0.09
Tetraconazole	18.935		0.01	0.9	7	2	0.999	2
Triadimefon	18.964		0.01	0.8	12	2	0.999	1
Fosthiazate 1	19.339	20.395	0.02	0.8	130	-59	0.999	0.1
Fosthiazate 2	19.408	20.474	0.02	0.7	170	-78	1.000	0.1
Chlorfenvinphos E	19.632	19.437	0.01	1.2	100	4	1.000	0.1
Chlorfenvinphos Z	19.899	19.849	0.01	0.8	170	-13	1.000	0.1
Phenthoate	20.063	19.994	0.01	0.7	190	5	1.000	0.09
Quinalphos	20.095	19.824	0.01	0.8	190	44	1.000	0.09
Thiabendazole	20.139		0.01	2.5	9	-23	0.994	2
Triadimenol	20.192		0.01	0.9	10	6	0.999	1
Methidathion	20.515	21.052	0.01	0.8	180	23	1.000	0.1
Chinomethionat	20.651		0.01	0.8	7	-2	0.999	2
Tetrachlorvinphos	20.692	20.794	0.01	0.8	130	-60	0.999	0.2
Fenothiocarb	20.845		0.01	1.1	14	-3	1.000	1
Imazalil	21.344		0.02	2.1	10	10	1.000	1
Prothiophos	21.392	20.489	0.01	0.9	190	26	1.000	0.1
Myclobutanil	21.754		0.01	0.8	12	0	0.999	1
Buprofezin	21.876		0.01	0.7	14	6	0.999	1
Kresoxim-methyl	21.882		0.02	0.7	3	6	1.000	3
Chlorfenapyr	22.128		0.01	0.9	5	5	1.000	2
Isoxathion	22.250	22.596	0.01	0.7	170	26	1.000	0.1
Oxadixyl	22.893		0.01	0.8	8	-1	1.000	2
Ethion	22.981	22.856	0.01	0.7	340	110	1.000	0.06
Triazophos	23.457	24.412	0.02	1.9	140	16	1.000	0.2
Sulprophos	23.500	23.018	0.02	0.7	170	2	1.000	0.1
Edifenphos	23.930	23.959	0.02	1.0	100	-70	1.000	0.2
Triphenyl phosphate ^{c)}	24.790	24.745	0.02	0.9	180	55	0.999	0.1
Acetamiprid	25.454		0.03	3.8	13	-13	0.996	3
Pyridaphenthion	25.463	26.353	0.01	0.8	170	-29	1.000	0.2
Iprodion	25.484		0.01	1.3	4	2	0.998	3
EPN	25.803	26.345	0.01	0.7	180	94	0.999	0.1

Table 1. Continued

Compound	RT, min		Repeatability (n=10)		Linearity ^{a)}			Detection limit ^{b)} , ng/g
	Blos NPD (DB-5ms)	FPD (DB-1701P)	RT, min RSD, %	Area RSD, %	Slope (×10)	Intercept (/10)	r ²	
Fenprothrin	26.140		0.01	1.2	4	4	0.999	3
Tebufenpyrad	26.316		0.01	1.2	9	10	0.999	1
Phosalone	26.932	27.722	0.01	0.7	150	120	0.999	0.2
Azinphos methyl	27.053	27.964	0.02	0.7	150	-220	0.999	0.2
Cyhalothrin 1	27.299		0.01	2.1	6	-1	1.000	3
Cyhalothrin 2	27.629		0.01	1.0	4	3	1.000	3
Fenarimol	27.905		0.01	0.8	9	2	1.000	2
Acrinathrin	27.993		0.01	1.5	3	3	0.999	4
Pyraclufos	28.473	28.747	0.01	0.8	140	-28	0.999	0.2
Bitertanol 1	28.954		0.01	0.9	10	1	1.000	2
Bitertanol 2	29.157		0.01	3.5	3	0	1.000	2
Pyridaben	29.381		0.01	0.7	3	11	0.999	4
Cyfluthrin 1	30.133		0.01	2.0	5	1	1.000	3
Cyfluthrin 2	30.328		0.01	1.5	4	3	0.999	3
Cyfluthrin 3	30.431		0.01	3.0	4	2	0.999	3
Cyfluthrin 4	30.523		0.01	3.1	4	0	0.999	3
Cypermethrin 1	30.741		0.01	2.2	4	3	0.999	3
Cypermethrin 2	30.946		0.01	2.2	3	1	0.999	3
Cypermethrin 3	31.041		0.01	2.3	5	0	0.999	3
Flucythrinate 1	31.079		0.01	0.8	5	0	0.999	3
Cypermethrin 4	31.131		0.01	2.8	4	0	0.999	3
Flucythrinate 2	31.474		0.01	1.3	5	2	0.999	3
Fenvalerate 1	32.569		0.01	0.9	5	5	1.000	3
Fluvalinate 1	32.884		0.01	0.8	6	3	0.999	3
Fenvalerate 2	33.059		0.01	1.1	3	4	0.999	3
Fluvalinate 2	33.059		0.01	0.8	6	5	0.999	3
Difenoconazole 1	33.604		0.01	0.8	8	6	0.999	3
Difenoconazole 2	33.765		0.01	0.8	8	6	1.000	3
Tralomethrin	34.455		0.01	1.0	2	-1	0.993	5
Azoxystrobin	34.906		0.01	0.8	9	-14	0.999	3

^{a)} Organo-phosphorus pesticides: 1-1,000 ng/g, nitrogen-containing pesticides: 10-10,000 ng/g.

^{b)} Detection limits calculated for a signal-to-noise ratio of 3 for standard solution (S/N=3).

^{c)} Retention index.

では、注入口の初期圧を 130 kPa と高く設定できた。これにより内径 0.32 mm のデュアルカラム方式と相まって、キャリアガス流量が 10 mL/min (GC/MS の 5~10 倍) と多くなり、気化した試験溶液が瞬時にカラムに導入されることから、高度に不活性化処理されたスプリットレスライナーなどの採用と、それらを汚さない試料調製法との相乗効果もあって、デュアルカラム GC-ブロス NPD ではマトリックス効果が大幅に抑制されるものと考えられた。

まとめ

確実な定性および定量を可能とするシングルインジェクション-デュアルカラム方式 GC に、高感度で再現性などに優れるブロス NPD を装備したデュアルカラム GC-ブロス NPD は、クロロフィル色素などの夾雑物を効率よく除去する試料調製法と組み合わせることによって、日常の食品中残留農薬分析に適用可能と判断される検討結果が得られた。

Table 2. Recoveries of 69 pesticides from fortified spinach

Pesticide	Recovery ^{a)} , %					
	Spiking level, µg/g	Dual-column GC - blos NPD			EI mode GC-MS	
		Group	Mean	RSD, %	Mean	RSD, %
Methamidophos	0.05	P2	73.9	4.6	117.9	5.3
Dichlorvos	0.05	P1	71.5	4.9	99.6	1.2
Acephate	0.05	P1	70.3	4.9	104.5	3.7
Fenobucarb	0.05	N1	92.0	3.3	96.0	1.9
Cadusafos	0.02	P2	96.8	1.5	97.9	1.0
Dimethoate	0.02	P2	93.3	6.1	109.9	3.9
Cyanophos	0.02	P2	93.3	1.4	105.6	1.3
Diazinon	0.02	P1	101.1	0.9	108.0	1.9
Chlorothalonil	0.05	N2	23.0	16.7	32.8	1.6
Iprobenphos	0.02	P2	98.4	2.8	98.5	0.7
Dichlofenthion	0.02	P1	97.1	1.5	100.3	2.6
Chlorpyrifos methyl	0.02	P1	98.6	0.8	103.1	1.4
Tolclofos methyl	0.02	P2	95.9	1.5	101.8	1.3
Carbaryl	0.05	N1	91.5	1.7	98.3	2.2
Metalaxyl	0.05	N2	94.5	2.1	106.8	1.3
Pirimiphos methyl	0.02	P1	96.8	0.9	100.8	0.7
Fenitrothion	0.02	P1	98.5	0.4	103.8	1.2
Malathion	0.02	P1	99.4	4.2	98.2	3.1
Chlorpyrifos	0.02	P1	99.6	1.7	106.8	4.8
Diethofencarb	0.1	N1	91.3	5.4	104.4	1.9
Dimethylvinphos	0.02	P1	101.3	4.0	-	-
Fenthion	0.04	P2	95.8	1.8	101.0	1.4
Parathion	0.02	P1	99.4	2.7	104.7	2.4
Tetraconazole	0.04	N2	94.6	2.3	-	-
Triadimefon	0.025	N1	92.8	5.4	94.1	1.0
Fosthiazate	0.02	P2	100.5	3.7	114.4	1.2
Chlorfenvinphos	0.02	P2	97.6	3.6	95.9	1.7
Phenthoate	0.02	P2	95.5	2.5	105.4	0.7
Quinalphos	0.02	P1	100.3	2.9	110.5	2.8
Thiabendazole	0.05	N2	89.6	8.1	107.0	2.8
Triadimenol	0.05	N1	98.9	5.0	99.5	0.7
Methidathion	0.04	P1	99.0	1.1	111.2	2.0
Chinomethionat	0.05	N1	83.6	4.1	78.4	1.6
Tetrachlorvinphos	0.02	P2	102.2	4.6	-	-
Fenothiocarb	0.05	N1	93.8	3.7	95.1	4.1
Imazalil	0.1	N1	89.3	6.1	98.3	5.0
Prothiophos	0.02	P1	101.1	3.5	98.5	1.3
Myclobutanil	0.025	N2	95.8	3.8	108.2	2.8
Buprofezin	0.025	N2	95.4	4.3	107.5	2.5
Kresoxim-methyl	0.1	N1	94.4	6.2	104.9	3.1
Chlorfenapyr	0.05	N1	95.0	4.0	112.1	9.5
Isoxathion	0.04	P1	99.2	0.8	108.6	2.0
Oxadixyl	0.05	N2	88.7	4.9	93.9	2.5
Ethion	0.02	P1	98.4	0.9	97.1	1.2
Triazophos	0.02	P1	97.3	2.4	106.8	0.5
Sulprophos	0.02	P2	97.7	2.4	-	-
Edifenphos	0.04	P2	96.1	2.7	113.6	2.2
Acetamiprid	0.03	N1	79.8	7.5	-	-
Pyridaphenthion	0.02	P2	103.3	3.5	105.5	2.3
Iprodion	0.05	N2	82.9	4.1	93.4	4.3
EPN	0.04	P1	98.1	0.5	101.7	1.2
Fenpropathrin	0.05	N1	90.1	4.0	92.2	2.2
Tebufenpyrad	0.05	N1	90.4	3.5	103.9	3.4
Phosalone	0.05	P1	94.8	0.9	117.6	3.5

Table 2. Continued

Pesticide	Spiking level, µg/g	Recovery ^a , %				
		Dual-column GC - blos NPD			EI mode GC-MS	
		Group	Mean	RSD, %	Mean	RSD, %
Azinphos methyl	0.05	P2	99.8	3.8	146.6	5.0
Cyhalothrin	0.05	N1	86.9	3.9	95.5	2.2
Fenarimol	0.1	N1	95.8	3.8	98.7	1.9
Acrinathrin	0.05	N2	30.5	6.6	59.0	5.0
Pyraclufos	0.04	P1	98.2	3.5	134.2	7.8
Bitertanol	0.1	N2	101.2	1.6	110.2	3.1
Pyridaben	0.1	N1	87.7	4.1	106.3	2.9
Cyfluthrin	0.1	N1	95.8	5.2	106.5	1.8
Cypermethrin	0.1	N2	95.2	4.9	103.3	2.6
Flucythrinate	0.1	N1	91.8	2.8	-	-
Fenvalerate	0.1	N1	89.8	5.2	106.7	2.0
Fluvalinate	0.1	N2	85.4	5.6	110.0	2.4
Difenoconazole	0.1	N1	97.2	5.0	129.4	6.7
Tralomethrin	0.1	N2	77.0	3.8	104.6	2.4
Azoxystrobin	0.1	N2	105.0	5.5	115.8	2.5

^a Average of 5 experiments.

文 献

- 1) Fillion, J., et al: Multiresidue method for the determination of residues of 251 pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography / mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection, J. AOAC Int., 83, 698-713, 2000.
- 2) Ueno E., et al: Multiresidue analysis of pesticides in vegetables and fruits by gas chromatography / mass spectrometry after gel permeation chromatography and graphitized carbon column cleanup, J. AOAC Int., 87, 1003-1015, 2004.
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品に残留する農薬，飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について，平成 17 年 1 月 24 日，食安発第 0124001 号，2005.
- 4) 上野英二：サロゲート物質の食品中残留農薬分析への利用について，食衛誌，49, J-309-J-313, 2008.
- 5) 上野英二：デュアルカラム GC の食品中残留農薬分析への利用について，食衛誌，47, J-299-J-304, 2006.
- 6) 梶島由佳 他：愛知県における野菜・果実中の農薬残留データに基づいたポジティブリスト制度下での農薬検査対象設定方法の検討，食衛誌，49, 283-293, 2008.
- 7) Ueno E., et al: Determination of nitrogen- and phosphorus-containing pesticide residues in vegetables by gas chromatography with nitrogen-phosphorus and flame photometric detection after gel permeation chromatography and a two-step minicolumn cleanup, J. AOAC Int., 86, 1241-1251, 2003.
- 8) Ueno E., et al: Determination of organophosphorus pesticide residues in onion and welsh onion by gas chromatography with pulsed flame photometric detector, J. Pestic. Sci., 28, 422-428, 2003.
- 9) 上野英二 他：データベースソフトウェアを用いた GC/M S による農産食品中残留農薬の多成分一斉分析法の検討，食衛誌，49, 316-319, 2008.
- 10) 農薬残留分析法研究班編：最新農薬の残留分析法，中央法規出版，p.189-191, 2006.
- 11) Erney D. R., et al: Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. J. Chromatogr., 638, 57-63, 1993.

Multi-residue analysis of pesticides in foods by gas chromatography with bios NPD

Eiji Ueno, Haruka Ohno, Takashi Tanahashi, Harumi Oshima, Eiichi Mikami

We evaluated a multi-residue method of pesticides in foods by single-injection, dual-column, and gas chromatography with bios nitrogen-phosphorus detection (dual-column GC - bios NPD). The sample was extracted with acetonitrile, and the extract was cleaned up by a salting-out step. Co-extractives were removed by gel permeation chromatography (GPC) / graphitized carbon column solid-phase extraction (SPE) and tandem silica gel / PSA cartridge column SPE. The test solution was determined by dual-column GC - bios NPD. In all cases, the repeatability studies (n=10) of retention time and peak area yielded RSD values lower than 0.07% (average of 0.01%) and lower than 3.8% (average of 1.2%), respectively, and calibration curves (organo-phosphorus pesticides: 1 - 1,000 ng/g, nitrogen-containing pesticides: 10 - 10,000 ng/g) were linear with correlation coefficients higher than 0.993. Sensitivity of the method was obtained with limits of detection ranging from 0.06 to 5 ng/g. Average recoveries of pesticides, except for chlorothalonil and acrinathrin, from fortified spinach sample ranged from 70.3 to 105.0% with RSD values of <8.1%.

Key words: pesticide residue, food, dual-column, GC, bios NPD

調 査 研 究

成人における生体内微量元素の 1 日尿中排泄量及び 必須元素の摂取状況モニタリング法に関する研究

林 留美子 小島美千代 椛島由佳 三上栄一

要 約

成人 33 名(男 25、女 8 名)の 1 日尿中に存在する生体内微量元素(16 元素: Cu、Zn、Se、Mo、Mn、Co、Li、B、Al、Ni、As、Rb、Sr、Cd、Sn、Pb)を ICP-MS により分析し、各元素の 1 日尿中排泄量 [$\mu\text{g/day}$] を算出した。その結果、16 元素における 1 日尿中排泄量の平均値は、B、Rb では $1000\mu\text{g/day}$ 以上であり、それに比べて Mn、Co、Al、Ni、Cd、Sn、Pb の 7 元素では $10\mu\text{g/day}$ 未満と少量であった。また、各元素における性別の 1 日尿中排泄量平均値の比較では、Cu、Zn、Se の 3 元素において性差が認められた ($p < 0.01 \sim 0.05$)。

Cu、Zn、Se の 3 元素について、「日本人の食事摂取基準(2005)」に対する摂取状況をモニタリングする方法を検討した結果、我々の概算法によって算出された 3 元素の 1 日摂取量は、国民健康・栄養調査及び報告された文献値とよく一致していた。また、これら 3 元素における 1 日摂取量概算値の平均値は、食事摂取基準に示された各元素の推定平均必要量を上回っており、これら必須元素が良好に摂取されている状況が推定された。

キーワード: 1 日尿中排泄量、微量元素、1 日摂取量

序 文

生体内には多くのミネラル(元素)が存在し、それらは互いにバランスを保って健康を維持している。一方、尿中に排泄される元素の量は、その摂取量や生体内蓄積量を少なからず反映することから、尿は健康を考える上で有用な検査材料の 1 つとなると考えられる。尿中には、Na、K などの電解質をはじめ生体内代謝における中間物質や最終産物、解毒排泄物質など様々な物質が含まれ、それらは食事や飲水、睡眠といった 1 日の生活リズムに関連して排泄されることが知られている¹⁾。そのため、臨床の場では 1 日(24 時間)尿を採集し、その中の標的物質を測定することによって診断の

指標に用いている。しかし、社会生活を営む成人が 1 日尿を採集することは非常に困難な作業となるため、一般成人における生体内元素等の 1 日尿中排泄量については、ほとんど知られていないのが現状である。そこで、成人における多元素の 1 日尿中排泄量を把握するため、24 時間尿比例採集器を用いて 1 日尿の 1/25 量を採集し、誘導結合プラズマ質量分析装置: ICP-MS を用いて尿中の Cu、Zn 等 16 種類の生体内微量元素について一斉分析を行った。

また、動物実験を始めとする様々な研究から、多くの元素がヒト等の哺乳動物にとって必須である²⁾ことが知られており、「日本人の食事摂取基準(2005 年版)」において

も13元素について摂取基準が策定³⁾されている。これら栄養素の摂取状況を調査する方法として、国民栄養調査では1日に摂取した食品を秤量記録し、計算によって摂取量を算出している。しかし、この作業は煩雑であり、また、Se、Crといった食品中に微量しか含まれない栄養素については調査されていないのが現状である。そこで、平成14年度の国民栄養調査⁴⁾で摂取不足が指摘されたCu、Zn、及び摂取量が未調査のSeの3元素については、1日尿中排泄量の結果から1日摂取量を概算し、摂取状況をモニタリングする方法について検討を加えた。

方 法

1. 調査対象者及び調査期間

調査協力の依頼に対して同意が得られた愛知県衛生研究所に勤務するボランティアの男25名、女8名の計33名とした。なお、対象者に対しては事前に研究内容についての説明を行い、書面による承諾を得た。

調査は、平成16年11月から12月にかけて実施した。

2. 1日尿試料の採取及び1日尿量の算出

24時間尿比例採集器(ユリンメートP、住友ベークライト)を用いて、1回尿の1/25量を24時間採集し、その全量を100mLの褐色ポリ瓶に入れて1日尿(1/25量)試料とした。

1日尿量(L)の算出は、100mLの褐色ポリ瓶に入った1日尿(1/25量)試料の全重量(g)から容器(100mLの褐色ポリ瓶)重量(g)を差し引いて、尿比重(g/mL)で割った値の0.025倍量として算出した。

3. 測定元素

ヒトにとっての必須微量元素(6元素): Cu、Zn、Se、Mo、Mn、Co、及びヒトでの必須性は明らかでない元素(10元素): Li、B、Al、Ni、As、Rb、Sr、Cd、Sn、Pbの計16元素

4. 尿試料の分析方法

尿20mLをテフロン製遠心管に採り、硝酸5mL(Ultrapur、関東化学)を加え、70℃水浴中で10mL以下まで濃縮酸分解後、超純水で10mLとし、ICP-MS: Agilent 7500i(横河アナリティカルシステムズ)を用いて1日尿試料中の16元素を一斉分析した。

5. ICP-MSの測定条件及び定量法

RFパワー; 1500 W

サンプリング位置; 8 mm

プラズマガス; Ar 15 L/min

ネブライザ; バビントン型

内部標準元素; Sc、Y、Bi

硝酸分解した尿の試験溶液をICP-MSに導入し、各元素のカウント数を内部標準のカウント数で割った数値と、標準溶液のそれと比較して定量した。

6. 1日尿中排泄量の算出

ICP-MSにより分析した16元素の尿中濃度 $[\mu\text{g/L}] \times 1$ 日尿量[L]、により各元素の1日尿中排泄量 $[\mu\text{g/day}]$ を算出した。

7. Cu、Zn、Seの1日摂取量モニタリング

Cu、Zn、Seの1日尿中排泄量を基に、それらの既知の代謝率から1日摂取量を算出し、3元素の摂取状況をモニタリングする方法を検討した。

結果及び考察

1. 16元素の1日尿中排泄量

成人33名における16元素の1日尿中排泄量の平均値 $[\mu\text{g/day}]$ を表1及び図1に示した。16元素における1日尿中排泄量の平均値(n=33)は、図1に示すようにRb、Bでは $1000\mu\text{g/day}$ 以上と多く、それに比べてAl、Ni、Pb、Mn、Cd、Sn、Coの7元素では $10\mu\text{g/day}$ 未満と少量であり、食品中にRbは $1\sim 100\text{mg/kg}$ 乾重、Bは $0.1\sim 50\text{mg/kg}$ 程度と多く含まれる²⁾ことから、食品中の元素量の違いがその要因と考えられる。また、一般成人における1日尿中排泄量に関する知見がないため、これまでに報告されている各元素の尿中濃度の文献値 $(\mu\text{g/L})$ ^{5,6)}に平均的な1日尿量の1.5(L)を乗じた値と比較すると、これらの結果は同程度の値であった。また、性別の16元素の1日尿中排泄量平均値±標準偏差を表1に示した。本調査においては、Cu、Zn、Seの3元素で性差が認められ($p < 0.01\sim 0.05$)だが、いずれも男が女より高く、その他の元素においても男のほうが高い1日尿中排泄量を示す元素が多くみられることから、食事の量による差ではないかと考えられた。

表1 16元素の1日尿中排泄量（平均値±標準偏差）

元素					(単位：μg/day)	
	全体 (n=33)	中央値	最小	最大	男 (n=25)	女 (n=8)
Cu	23 ± 8.8	22	9.9	50	25 ± 8.9	16 ± 2.0
Zn	410 ± 220	390	69	1000	460 ± 220	260 ± 120
Se	45 ± 23	40	15	110	50 ± 24	31 ± 6.6
Mo	100 ± 75	87	21	400	110 ± 82	79 ± 41
Mn	1.1 ± 0.40	1.1	0.39	2.1	1.2 ± 0.42	0.91 ± 0.24
Co	0.27 ± 0.15	0.24	0.070	0.69	0.25 ± 0.14	0.36 ± 0.17
Li	15 ± 11	13	6.1	66	16 ± 12	11 ± 3.1
B	1000 ± 440	820	450	2200	1000 ± 460	1000 ± 430
Al	8.0 ± 5.9	5.3	2.7	33	8.4 ± 6.6	6.9 ± 3.3
Ni	3.1 ± 1.1	3.1	1.5	5.7	3.1 ± 1.2	3.2 ± 0.99
As	190 ± 110	160	60	610	210 ± 120	130 ± 59
Rb	1400 ± 570	1200	680	3100	1400 ± 580	1300 ± 600
Sr	240 ± 130	220	69	660	250 ± 140	190 ± 100
Cd	1.1 ± 0.51	1.0	0.46	2.9	1.1 ± 0.52	1.1 ± 0.51
Sn	1.1 ± 0.51	0.87	0.42	2.6	1.2 ± 0.54	0.83 ± 0.28
Pb	1.8 ± 0.68	1.7	0.85	3.4	1.8 ± 0.62	1.7 ± 0.89

* ; p<0.05 ** ; p<0.01

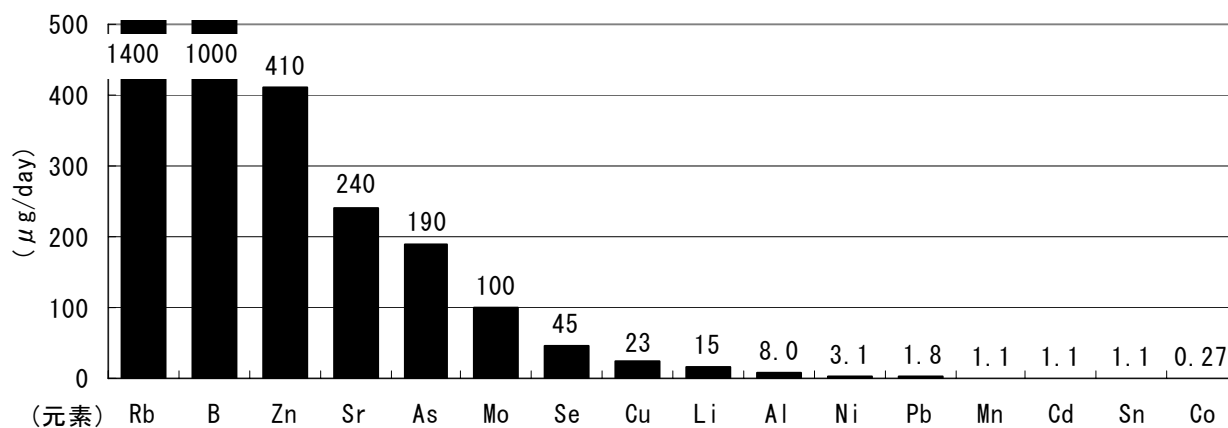


図1 16元素の1日尿中排泄量平均値 (n=33)

2. Cu, Zn, Seの1日摂取量モニタリング

国民栄養調査⁴⁾で摂取不足が指摘されたCu, Zn、及び摂取量が未調査のSeの3元素について各元素の1日尿中排泄量を基に、それらの既知の代謝率^{2,7)}から1日摂取量を概算し(概算法)、「日本人の食事摂取基準(2005年版)」に示された推定平均必要量(50%のヒトが必要量を満たすと推定され

る1日摂取量の基準)に対する摂取状況のモニタリングについて検討した。なお、食事摂取基準は性・年代別に示されているため、本研究では例数が多い男性についてのみ検討を加えた。

(1) Cu

Cuの食事からの吸収率は25~65%とされ、吸収されたCuの90%以上が糞便中に、尿中

へは4%程度が排泄される^{2,7)}。そこで、吸収率を45%、尿中排泄率を4%とした次式によってCuの1日摂取量(mg)を算出した。

$$1 \text{ 日 摂 取 量 } [Cu:mg] = 1 \text{ 日 尿 中 排 泄 量 } [Cu:mg/day] \times 100 / 4 \times 100 / 45$$

その結果、算出されたCuの1日摂取量平均値は1.4 mg(中央値:1.4 mg)と、Cuの推定平均必要量(0.6 mg/day:30~50歳代男性)を上回っており、平成15年度の国民健康・栄養調査⁸⁾における1日摂取量の平均値1.3mg(30~50歳代男性2,130名)及び、文献値の1.1~2.3 mg⁷⁾と同程度の結果であった。また、概算の結果では、Cuの推定平均必要量を満たさなかったのは25名中1名であり(図2)、成人における1日摂取量の上限量:10 mg/dayを超える者はなかった。

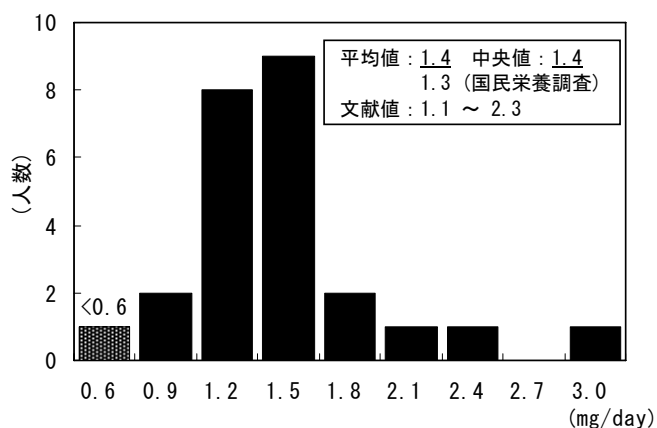


図2 Cuの1日摂取量概算値ヒストグラム
《日本人の食事摂取基準(2005)》
*推定平均必要量(男) 30-69歳
: 0.6 mg/day
*上限量: 10 mg/day

(2) Zn

Znの食事からの吸収率は、その摂取量に影響されて10~90%と大きく変化することが知られているが、吸収されたZnの75%以上は糞便中に、尿中へは5~8%程度が排泄^{2,7)}される。そこで、吸収率を50%、尿中排泄率を7%とした次式によってZnの1日摂取量(mg)を算出した。

$$1 \text{ 日 摂 取 量 } [Zn:mg] = 1 \text{ 日 尿 中 排 泄 量 } [Zn:mg/day] \times 100 / 7 \times 100 / 50$$

その結果、算出されたZnの1日摂取量平均値は13 mg(中央値:12 mg)と、Znの推定平均必要量(8 mg/day:30~50歳代男性)を上回っており、平成15年度の国民健康・栄

養調査における1日摂取量の平均値9.5 mg(30~50歳代男性2,130名)より多かったが、文献値の8~14 mg⁷⁾とは同程度の結果であった。また、概算の結果、Znの推定平均必要量を満たさなかったのは25名中4名と2割弱を占めていた(図3)が、国民健康・栄養調査での摂取量不足者の割合が不明であることから、本調査の概算値における摂取量不足者をどう評価すべきか明らかではない。なお、Znにおける1日摂取量の上限量:30 mg/dayを超える者はなかった。

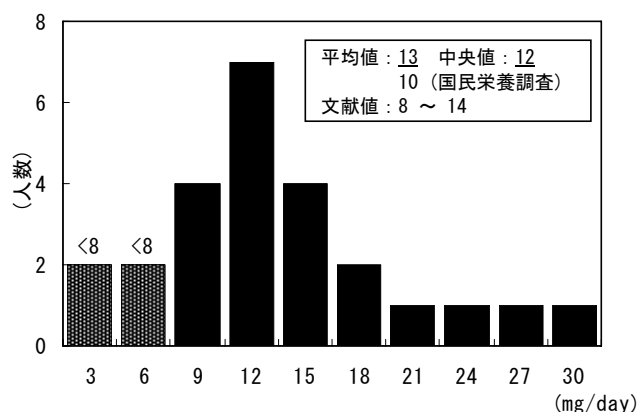


図3 Znの1日摂取量概算値ヒストグラム
《日本人の食事摂取基準(2005)》
*推定平均必要量(男) 30-69歳
: 8 mg/day
*上限量: 30 mg/day

(3) Se

Seの食事からの吸収率は70~80%とされ、吸収されたSeの50~80%が尿中へ排泄^{2,7)}される。そこで、吸収率を75%、尿中排泄率を65%とした次式によってSeの1日摂取量(μ g)を算出した。

$$1 \text{ 日 摂 取 量 } [Se:\mu g] = 1 \text{ 日 尿 中 排 泄 量 } [Se:\mu g/day] \times 100 / 65 \times 100 / 75$$

その結果、算出されたSeの1日摂取量平均値は102 μ g(中央値:89 μ g)と、日本人におけるSe摂取量100 μ g/day²⁾と良く一致し、Seの推定平均必要量(30~40歳代30、50歳代25 μ g/day)を大きく上回る摂取量を示し、25名すべてが推定平均必要量を満たしていた(図4)。また、Seにおける1日摂取量の上限量:450 μ g/dayを超える者はなかった。

これらの結果から、Cu、Zn、Seについては、食事からの吸収率、尿中排泄率及び1日尿中排泄量を用いた概算法によって、集

団としての1日摂取量の概要をモニタリングできる可能性が示唆されたと考えられる。

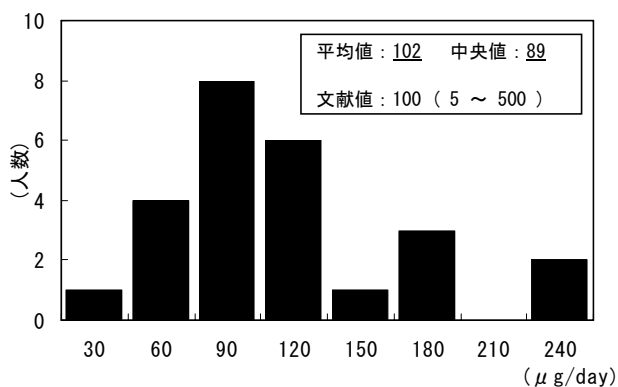


図4 Seの1日摂取量概算値ヒストグラム
《日本人の食事摂取基準(2005)》
*推定平均必要量(男)
30-49歳: 30 μg/day
50-69歳: 25 μg/day
*上限量: 450 μg/day

まとめ

成人 33 名(男 25、女 8 名)の 1 日尿を採集し、1 日尿中の微量元素(16 元素: Cu、Zn、Se、Mo、Mn、Co、Li、B、Al、Ni、As、Rb、Sr、Cd、Sn、Pb)を ICP-MS により一斉分析した結果、1 日尿中排泄量の平均値は、Rb、B では 1000 μg/day 以上と多く、それに比べて Al、Ni、Pb、Mn、Cd、Sn、Co の 7 元素では 10 μg/day 未満と少量であった。また、1 日尿中排泄量における性差については、Cu、Zn、Se の 3 元素において男が女より有意に高く ($p < 0.01 \sim 0.05$)、食事の量によることが考えられた。

国民栄養調査で摂取不足が指摘された Cu、Zn、及び摂取量が未調査の Se の 3 元素について、「日本人の食事摂取基準(2005)」に対する摂取状況をモニタリングする方法を検討した結果、ICP-MS 分析によって得られた 1 日尿中排泄量[μg/day]を用いた概算法による 3 元素の 1 日摂取量(男 25 名)は、国民健康・栄養調査とよく一致した結果が得られた。また、その 1 日摂取量平均値及び中央値 ($n=25$) は、いずれも食事摂取基

準に示された 3 元素の推定平均必要量を上回っており、これらが良好に摂取されている状況が推定された。

最後に、本調査結果は、当所に勤務する 30~50 歳代の男女 33 名という小集団における結果ではあるが、成人における生体内微量 16 元素の 1 日尿中排泄量に関する貴重な基礎データとなると考えられる。

謝 辞

本研究は、第 11 回(平成 16 年度)「地域保健福祉研究助成」(財団法人 大同生命厚生事業団)により実施しました。研究助成をいただきました大同生命厚生事業団に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) 金井正光編: 臨床検査法提要: 改訂 32 版, p. 161-205, 1806, 金原出版, 2005.
- 2) 糸川嘉則[編集]: ミネラルの事典: 初版, p. 138-531, 朝倉書店, 2003.
- 3) 日本人の食事摂取基準(2005 年版): 厚生労働省, 2005.
- 4) 平成 14 年 国民栄養調査結果の概要について: 厚生労働省, 2003.
- 5) Rodushkin I, Odman F: Application of inductively coupled plasma sector field mass spectrometry for elemental analysis of urine, J Trace Elem Med Biol, 14(4), 241-247, 2001.
- 6) Rodushkin I, et al: Multi-element analysis of body fluids by double-focusing ICP-MS, Transworld Res Network Recent Res Devel Pure & Applied Chem, 5, 51-66, 2001.
- 7) WHO 飲料水水質ガイドライン(第 2 版)第 2 巻 健康クライテリアと関連情報: 日本水道協会, 1999.
- 8) 平成 15 年 国民健康・栄養調査結果の概要について: 厚生労働省, 2005.

Estimation of daily intake of trace elements based on the measurement of trace element excretion levels in the 24-hour urine samples from healthy adults

Rumiko Hayashi, Michiyo Kojima, Yuka Kabashima, Eiichi Mikami

We measured the urinary excretion of 16 trace elements by analyzing the 24-hour urine from 33 healthy adults (25 male, 8 female) using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). The mean values of B and Rb were >1000 µg/day, whereas those of seven elements (Mn, Co, Al, Ni, Cd, Sn and Pb) were <10µg/day. We observed significant ($p < 0.01-0.05$) differences in the urinary excretion of Cu, Zn and Se among the sexes. Based on these internal exposure values we calculated the daily intake of Cu, Zn and Se using urinary metabolite excretion factors. The calculated daily intake values of the three elements were comparatively similar with those reported in the national nutritional survey. The mean of the calculated daily intake values of the three elements exceeded the reference values in Dietary Reference Intakes for Japanese (2005 edition), suggesting that the three elements have satisfactorily been taken in.

Key words : excretion levels in the 24-hour urine, trace elements, daily intake

調 査 研 究

新型インフルエンザ A/H1N1 発生に対する

愛知県衛生研究所の対応検証(第1報)全数報告期の総括

皆川洋子 安井善宏 秦 眞美 小林慎一 伊藤 雅
藤原範子 水谷絵美 安達啓一 山下照夫 下岸 協
續木雅子 竹島雅之 広瀬かおる 判治岳史 遠山明人

要 旨

2009年4月にメキシコ及び米国で探知され、同月27日世界保健機関(WHO)のフェーズ4宣言により確認された新型インフルエンザ A/H1N1(以下新型 flu)の発生に対して、名古屋市を除く愛知県内15保健所のウイルス行政検査検体が集まり基幹感染症情報センターの置かれる当所は、全国の地方衛生研究所と同様速やかに新型 flu ウイルス検出・確認体制を構築するとともに関連情報の提供を強化した。国内発生探知前は海外からの帰国症例、国内患者発生報告後は集団発生及び帰国症例を重点的に検査した。6月に入り患者第1、2例発生後全数報告終了までの約8週間に300名余りを確認し、名古屋市と併せた愛知県の患者数は420名を超え都道府県別では大阪府・神奈川県に次ぐ数を記録した。県内に国際空港があり三大都市圏に立地する当所における新型 flu 発生への対応について、全数報告期を中心に検証するとともに、新型 flu 発生後の各段階における地方衛生研究所の役割について考察する。

キーワード：新型インフルエンザ、ウイルス分離、遺伝子解析、陰性確認、危機管理

序 文

2009年4月メキシコでの発生が確認された新型インフルエンザ A/H1pdmN1(pdm=pandemic:発生当初はA/sw(swine=豚)H1N1, A/H1v(v=variant)N1とも表記、以下新型 flu)は、5月には渡航歴のない患者第1例が神戸市内で確認され、愛知県では6月1日に患者第1、2例を確認した。その後全数報告終了(7月24日)までに名古屋市を除く県内全域より300名余りの患者発生が確認された。感染は夏季も拡大し1968年「香港カゼ」以来のパンデミー(パンデミック)となった。本県においてもパンデミー第1波が認められ、10月8日に発令された愛知県インフルエンザ警報は、2010年2月17日解除

まで4か月余り継続された(表1、図1)。

21世紀最初のパンデミーへの備えは既に前世紀から始まっていた。1995年以降諸外国からH5, H7, H9鳥インフルエンザのヒト感染報告があり、とくにH5N1は2001年以降インドネシア、中国、エジプト等から毎年症例報告が続いており、日本のNational Influenza Centerのある国立感染症研究所(感染研)と全国の地方衛生研究所(地衛研)は、病原体サーベイランス[surveillance=(発生・変異等の)「監視」]体制強化を模索していた。

2008(平成20)年5月感染症の類型に「新型インフルエンザ等感染症」が追加され、病原体診断を要する「無症状病原体保有者」

表 1 新型インフルエンザ A/H1N1 の経過と当所の主な対応(2009 年海外発生探知～2010 年 2 月)

月日	国の主な対応・ 世界の状況	愛知県内の状況・ 県の主な対応	患者発生国数・ 患者数[死者数] 愛知県(日本)の 累積患者数	愛知県衛生研究所の状況
4月24日	メキシコ及び米国で豚インフルエンザのヒト感染確認			豚インフルエンザ A/swH1N1 に関する情報収集開始
4月26日		本庁・保健所に相談窓口を設置		
4月27日	「政府対応方針」を公表	「愛知県新型インフルエンザ対策本部幹事会」開催		所内検査体制の確認 本庁から機器整備の要否照会 →シーケンサー配備を要求
4月28日	世界保健機関(WHO)がフェーズ4を宣言(日本時間) 発生段階を「第一段階海外発生期」に引き上げ 「基本的対処方針」を決定 機内検疫を開始	「愛知県新型インフルエンザ対策本部会議」開催 保健所に発熱相談センターを設置		マスメディア取材(概ね5月16日まで) インフルエンザ PCR 検査 1 件実施
4月30日	WHOがフェーズ5を宣言		9カ国 154[8]	業務継続計画(BCP)見直し 5月1日 県医師会環境衛生委員会 衛研ウェブページに豚インフルエンザウイルスに関する記事掲載
5月1日	新たな「基本的対処方針」を決定			感染研より PCR プロトコル提示及び試薬受領・PCR 立ち上げ
5月9日	成田空港検疫所で日本人3人の感染者を確認		29カ国 3,440[48]	
5月11日			30カ国 4,694[53]	(5月11日～31日の期間に PCR 検査 77 件実施)
5月16日	神戸市内において国内初の感染者を確認 「第二段階国内発生早期」に引き上げ			保健所医師研修受入れ一時中止
5月18日		全国知事会議が新型インフルエンザ対策に関する緊急決議を採択		集団発生事例の PCR 検査増加
5月22日	新たな「基本的対処方針」を決定		0(321)	(5月下旬) シーケンサー(遺伝子塩基配列解析装置)緊急配備
6月1日		海外からの帰国者2名の感染を確認	62カ国 17,410[115] 2(385)	PCR 検査及びシーケンス確認実施
6月2日		海外からの帰国者1名の感染を確認	3	ウェブページに患者発生状況を掲載(以後毎日更新) 陰性確認検査開始
6月7日		入院患者1名が退院	3	
6月9日		入院患者1名が退院	3(457)	
6月12日	WHOがフェーズ6を宣言	名古屋市において感染者1名を確認	74カ国 29,669[145] 4(539)	
6月15日		岡崎市において感染者3名を確認 名古屋市において大学生1名の感染確認	76カ国 35,928[163] 11(638)	

表1 (続き)

月日	国の主な対応・ 世界の状況	愛知県内の状況・ 県の主な対応	患者発生国数・ 患者数[死者数] 愛知県(日本)の 累積患者数 [日本の死者数]	愛知県衛生研究所の状況
2009年 6月17日		豊橋市において感染者 1名を確認	20(665)	保健所医師研修受入れ再開
6月19日	原則として自宅療養に変更	陰性確認中の入院患者 が全て退院	27(740)	陰性確認検査終了
6月22日		豊田市において感染者 1名を確認	35(892)	
6月25日		関東を修学旅行中の中 学生において集団発生	61(1,048)	修学旅行より帰宅後発症した 生徒を検査(6名新型確定)
6月28日		100例目の発生を確認 (県内第1例発生確認 から28日)	116カ国 70,893[311] 100(1,207)	
7月5日		200例目の発生を確認 (同35日)	203(1,779)	
7月14日		300例目の発生を確認 (同44日)	308(1,924)	
7月22日		400例目の発生を確認 (同52日)	407(4,246)	
7月24日	全数把握→定点、クラス ター、及び入院把握に変 更	確認患者数 422例(大 阪府、神奈川県に次ぐ)	134,503 [816] 422(5,038)	愛知県 422名 当所検査確定者 300名(他 に7月24日検査陽性確定 者5名)
8月10日		「愛知県新型インフルエ ンザ専門家会議」		
8月15日	沖縄県内で国内初の死 亡者を確認		[1]	(8月中旬)リアルタイム PCR 1台増設
8月19日		愛知県内初の死亡者確 認(名古屋市)	[3]	(9月~12月) 新型インフルエンザに関する 研修会等で講演
8月21日	国内流行入り発表			
9月28日		インフルエンザ注意報 発令		
10月1日	基本的対処方針等を改定			
10月8日		インフルエンザ警報 発令		
10月23日		医療従事者へのワクチ ン接種開始		
11月9日			[55]	名古屋市(累計5例)を除く 県初の死亡例確認
12月6日			[100]	死亡例2例目(愛知県8例 目)確認
12月21日	PCR検査対象を季節性を 含む重症インフルエンザ疑 い患者に変更		[127]	タミフル耐性変異マーカー累 計 2件検出(愛知県累計4件)
2010年 1月26日		優先接種対象者以外 へのワクチン接種開始	[180]	
2月18日		インフルエンザ警報 解除	[193]	死亡例確認累計8例(愛知 県16例)

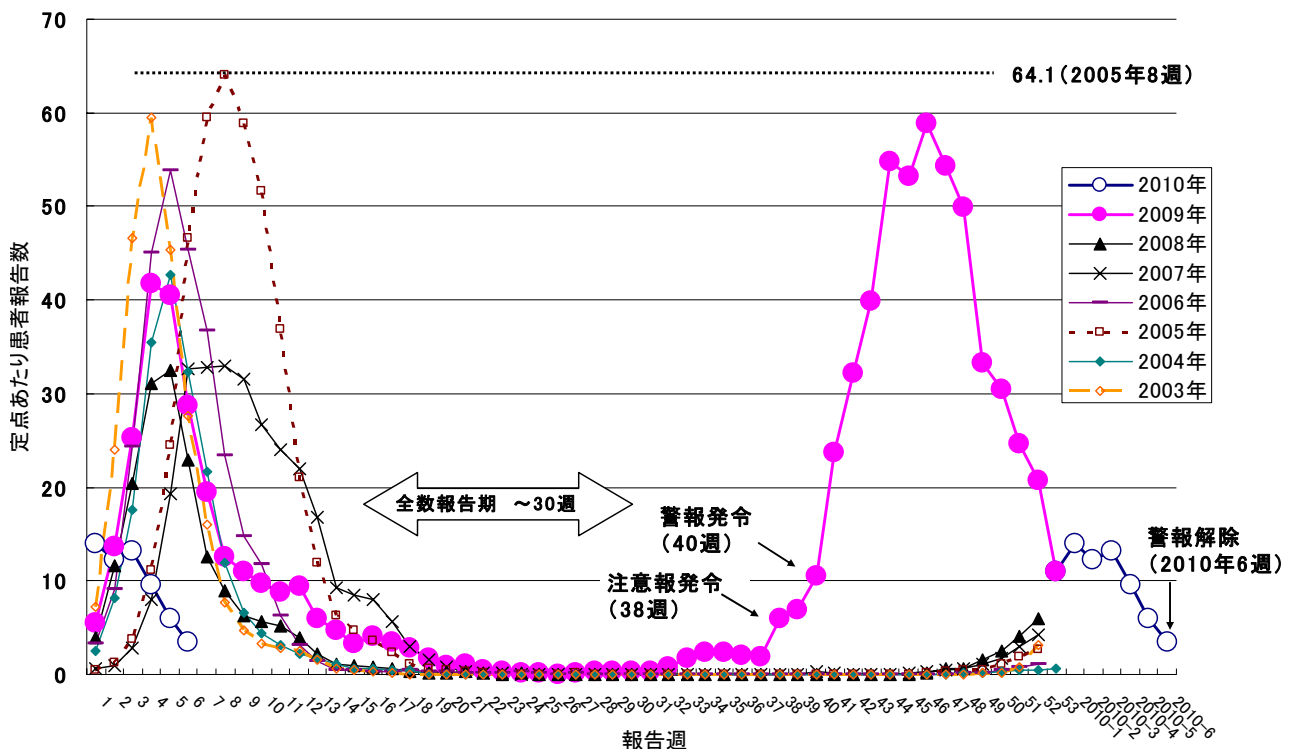


図1 愛知県におけるインフルエンザ定点からの患者報告数の推移

の扱いが明記された¹⁾ことは、従来分離を主としていたインフルエンザウイルス検査に、reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR)法等遺伝子核酸増幅をはじめとする迅速検査体制の導入を促し、全国地衛研にとっては同年8月に感染研が開催したリアルタイム(以下real)RT-PCRを用いた鳥インフルエンザウイルス検出法研修が転換点となった。この間当所は、国際空港を擁し海外拠点をもつ企業が多いという地域特性を考えウェブページ等を通じて海外発生情報提供を図るとともに、リアルタイムPCR機器要求や検査当番制導入等体制強化に努めていた。また以前より名古屋検疫所中部空港支所と連携して、入国時の季節はずれインフルエンザウイルス分離を行っていた²⁾。

厚生労働省(以下厚労省)からは、新型flu患者の診断確定にあたりウイルス亜型鑑別³⁾を求められたため、地衛研は海外発生直後より感染研とともに新たな亜型検出体制確立に傾倒し、新型fluの海外発生情報入手から1週間以内に検査を開始した。

当所がウイルス検査を担当する人口は、平成21年7月現在741万人を数える愛知県

民のうち指定都市として独自の地衛研をもつ名古屋市(人口225万人)を除き中核市(豊橋市、岡崎市及び豊田市)117万人を含む515万人(国民の約4%)にのぼる。パンデミー初期やウイルス病原性・薬剤感受性変異発生時などに、県12保健所及び中核市3保健所からの検査依頼が短期間に著増する可能性は看過できない。他府県に比べ担当する人口あたり職員数及び機器設備の少ない当所における新型flu発生への対応の記録及び検証を試みるとともに、パンデミーの各段階に必要な地衛研の機能について考察する。

材料と方法

1. 記録対象

2008年8月感染研によるreal RT-PCR研修受講から、2009年12月21日入院サーベイランス対象が重症患者に限定されるまでのウイルス検査及び患者発生動向を、海外発生から全数検査終了までの期間を中心に記録する。なお検査体制の構築及び維持、患者発生情報提供及び陰性確認の詳細は別に報告する⁴⁾。

表2 措置入院患者における陰性確認検査の実施状況

症例	性別 ・年齢階層	渡航歴等感染経路に関する情報 (発症日を0日)	診断病日	陰性確認 病日	最終検査 結果	H275Y 遺伝子 マーカー
1	女・40歳代	渡航歴有・-1日に帰国	0	8	陰性	H(感受性)
2	女・20歳代	渡航歴有・0日に帰国	2	10	陰性	H(感受性)
3	女・30歳代	渡航歴有・4日に帰国	5	18	陰性	H(感受性)
4	女・30歳代	渡航歴有・0日に帰国	2		陽性	H(感受性)
5	女・20歳代	学生、大学で発生有	2		陽性	H(感受性)
6	女・18歳	5と同じ大学の学生	2		陽性	H(感受性)
7	男・18歳	5と同じ大学の学生	3		陰性	H(感受性)
8	男・30歳代	国内出張中に発症	1		陽性	H(感受性)

2. 陰性確認

2-1 検査対象:名古屋市を除く愛知県において2009年6月19日以前に新型インフルエンザA/H1N1と診断され入院した20名のうち、発症後5日以上経過した8名(表2)。8名の性別は男2名女6名、年齢は18歳～41歳(平均27.0歳)。

2-2 検査方法:検体(鼻腔若しくは咽頭拭い液)は、採取後速やかに所管保健所により冷蔵状態で搬入された。PCR検査の標準作業書(Standard Operation Procedure: SOP)に従いRNA抽出の後real RT-PCR(A型M遺伝子及びswH1を各々duplicate計4well/検体)を実施した。

2-3 陰性の判定:上記4well全てがCt>40(40サイクル以内に立上り無)を示した検体は陰性、4wellのうち1wellでもCt≤40(40サイクル以内に立上り有)を示した検体は陽性と判定した。

結 果

1. 新型flu発生に対する対応

1-1 新型flu発生前

新型flu発生への準備にあたり、2008年に県12保健所の行政検査依頼は県庁健康福祉部健康担当局健康対策課感染症グループ(2009年10月より健康対策課新型インフルエンザ対策室)を経由する旨確認するとともに、中核3市には予め検査に関して県庁と情報を共有する旨了承してもらい、業務の円滑な遂行を図った。

1-2 海外発生国内未探知期(2009年4月～5月)(図2)

感染研から新たな検査マニュアル⁵⁾とともにプライマー、プローブ及び豚インフルエンザウイルス由来陽性対照が配布され、大型連休中にswH1を増幅・検出するreal及びconventional(以下conv)RT-PCR検査体制を確立した。また、「検体採取機関→保健所→当所への検体搬入」作業を円滑に進める目的で、厚労省及び感染研の通知⁶⁾等から関係部分を抜き書きし、WHO⁷⁾やCDC⁸⁾が発表した新型flu情報の概要とともに愛知県衛生研究所ウェブページ<http://www.pref.aichi.jp/eiseiken/>に掲載した。

新型flu症例定義(蔓延地域への渡航歴及び迅速診断A型陽性)に100%適合しない症例についても、診察医の所見を尊重した保健所等行政からの依頼があれば24時間対応(表3)し、結果的に世界各地からの帰国者より季節性インフルエンザウイルスを検出した。因みにPCR依頼のうち症例定義に完全に適合した症例は、愛知県新型flu第2例が初めてであった。

本県の新型fluに関するマスメディア対応は県庁であるが、ウイルスの特徴や患者発生動向、検査機器や検査の原理等に関する取材には従来どおり当所も対応した。後に県内患者発生を報じるニュース等で用いられた資料映像の多くは、この時期の取材に併せて収録されたものである。

前年度に制定した業務継続計画(Business

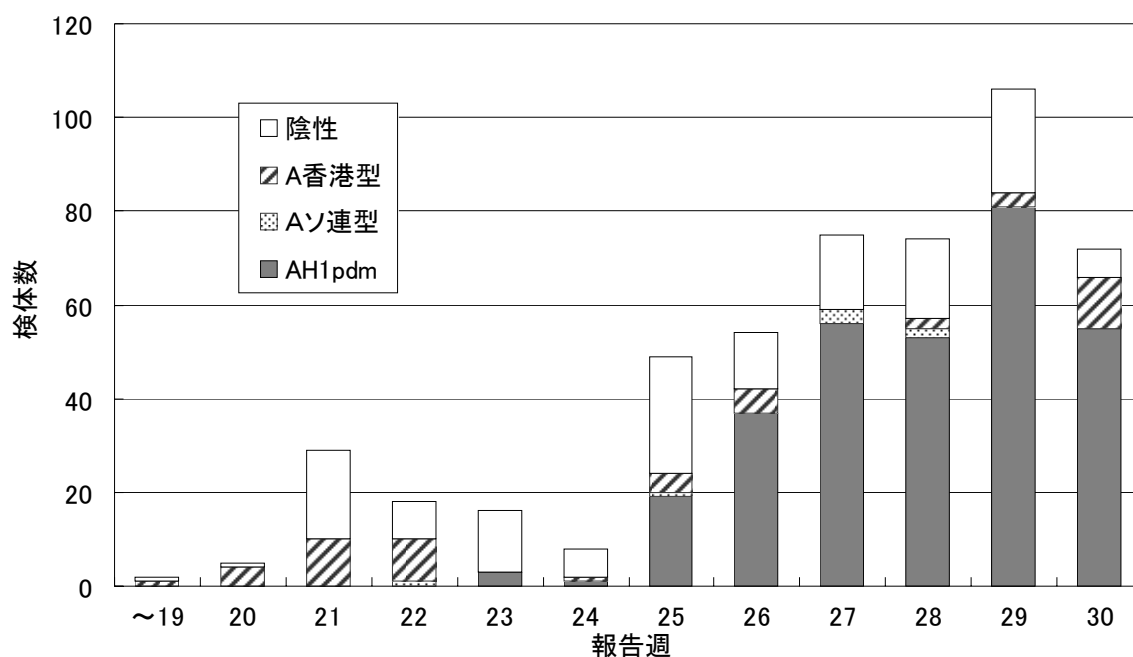


図2 新型インフルエンザA/H1N1全数報告期におけるA型インフルエンザ遺伝子検出状況（名古屋市を除く愛知県）

表3 新型インフルエンザA/H1N1全数報告期における保健所別検体搬入状況の概要（名古屋市を除く愛知県）

時期	国内発生		県内発生措置入院			全数報告							小計
	国内未発生	国内発生 県内未発生	6/1- 6/7	6/8- 6/14	6/15- 6/19	6/20- 6/21	6/22- 6/28	6/29- 7/5	7/6- 7/12	7/13- 7/19	7/20- 7/24		
尾張1	4/28- 5/16	5/18- 5/24	5/25- 5/31	6/1- 6/7	6/8- 6/14	6/15- 6/19	6/20- 6/21	6/22- 6/28	6/29- 7/5	7/6- 7/12	7/13- 7/19	7/20- 7/24	85(26)
尾張2						3(1)		10(8)	5(4)	5(2)	4(4)	5(4)	32(23)
尾張3			1(0)	1(0)		1(1)			1(1)	4(2)	3(3)	2(2)	13(9)
尾張4		5(0)	2(0)			1(0)		6(5)	3(2)	3(3)	3(3)	1(1)	24(14)
尾張5		1(0)	2(0)	2(0)	1(0)	2(1)	2(2)	10(6)	18(12)	7(6)	8(8)	7(5)	60(40)
尾張6		1(0)	3(0)	4(1)		9(3)				4(3)	2(2)		23(9)
尾張7		2(0)	3(0)	6(0)		1(0)	1(0)	2(1)	1(1)	1(1)			17(3)
尾張8	1(0)	2(0)		1(0)	1(1)	7(1)	2(1)	4(2)	7(6)	8(6)	13(9)	4(4)	50(30)
三河1	4(0)	9(0)	3(0)	1(0)	2(0)	9		3(0)	5(4)	16(15)	23(16)	12(11)	87(49)
三河2			1(0)					1(1)	1(1)	1(1)	7(6)	9(8)	20(17)
三河3	1(0)	1(0)		6(1)	8(0)	2(1)		1(0)	6(4)	5(2)	10(7)	8(4)	48(19)
三河4	1(0)	1(0)		1(0)				1(0)					4(0)
中核1		1(0)				4(1)			3(3)	1(1)	10(10)	5(3)	24(18)
中核2					1(0)	4(4)		3(3)	13(9)	6(5)	16(8)	13(8)	56(37)
中核3					1(0)	1(0)		4(4)	4(3)		3(2)	4(4)	17(13)

* () 内は新型インフルエンザ患者確定数（陰性確認検査、季節性インフルエンザ患者を除く）

Continuation Plan: BCP)は致死率の高いA/H5N1 ウイルスを前提としていたため、致死率は季節性並みであるが職員の間で蔓延する可能性の高いA/H1N1 に合わせて修正を加え、日常業務縮小やN95 マスク使用等は適用を停止した。

1-3 国内発生県内未探知期(2009年5月)

県により当所にシーケンサーが緊急配備された。2009年は例年季節性インフルエンザ陽性検体が急減する5月以降も引き続き季節性インフルエンザウイルスを検出した(図2)。このうち海外からの帰国患者

表4 新型インフルエンザA/H1N1全数報告期におけるA型インフルエンザ検出患者の渡航地域
(愛知県 但し季節性は名古屋市を除く)

検出ウイルス 血清型	AH1pdm 新型	AH1 (USSR) 季節性：ソ連型	AH3 季節性：香港型
渡航歴有/総数 (%)	54/422 (12.7%)	5/7 (71.4%)	16/51 (31.4%)
渡航地域等	アメリカ合衆国 カナダ ペルー、グアテマラ グアム、ハワイ 台湾 フィリピン インドネシア マレーシア、シンガポール タイ、ベトナム クロアチア、スロベニア オーストラリア	中国 フィリピン	ハワイ 中国、香港 フィリピン マレーシア、 シンガポール タイ インド チェコ、ハンガリー ナイジェリア オーストラリア

の渡航先は多様(表4)であった。

5月16日神戸市より海外渡航歴のない患者発生が報告され、県内発生は不可避と考えられた。患者の迅速な把握をめざして、新たに感染症発生動向調査検体のうちインフルエンザ疑い分及び学校等の集団発生事例を全てPCR対象(A型はreal+conv、B型はconvのみ)としたところ、B型及びA香港型(AH3)季節性インフルエンザウイルスを検出・分離した。

1-4 県内発生期(2009年6月以降)

1-4-1 措置入院期(~6月19日)

県内第1~4例についてはreal及びconv RT-PCR陽性確認に続いてH1増幅産物の塩基配列を決定し、swH1と確認した。

6月14日に確認した当所第4例(名古屋市と併せ第7例)までは第4例(名古屋市1例)を除いて帰国直後の発症であった。しかし同日名古屋市により渡航歴のない大学生患者が確認され、翌15日には当所でも同じ大学に通う学生症例を確定して以降、県内の大学・短大・専門学校生と帰国者、蔓延地からの旅行者等の患者確認が全数報告終了まで途切れなかった(図3)。

1-4-2 全数報告期(~7月24日)

当初患者の主体は大学生であったが次第に年齢が低下し、高校、中学、小学生に拡大した。首都圏・関西及び福岡とは異なり、全数報告期に探知された集団発生は関東へ

の修学旅行中に発生した中学生1事例のみであった(表1)。

全国からの報告数は約5,000名、都道府県別にみると愛知県(422名)は大阪府、神奈川県に次いで3番目に多かった。

なお新型に混じってA香港型季節性インフルエンザウイルスも全数報告最終日まで検出された(図2)。季節性と新型が同時に陽性となる検体は経験しなかった。

1-4-3 クラスターサーベイランス、入院サーベイランス移行後

流行の本格化に伴い、9月下旬より入院サーベイランス検体数が増加しはじめ、11月には7月の全数検査時レベルに達した(図4)。11月には名古屋市以外初となる県内死亡例、12月には、10月下旬ウイルスサーベイランス協力医療機関の外来で採取された検体由来ウイルス株にオセルタミビル耐性遺伝子マーカー(H275Y)を検出した。12月末までに69検体中2件がH275Y耐性遺伝子マーカー陽性を示し、感染研における薬剤感受性検査の結果は2件とも「オセルタミビル耐性、ザナミビル感受性」株であった。

全数報告終了直後より季節性インフルエンザウイルス検出は激減し、8月以降A香港型輸入例2例を除いて新型のみが検出される状況が2010年2月まで続いている。

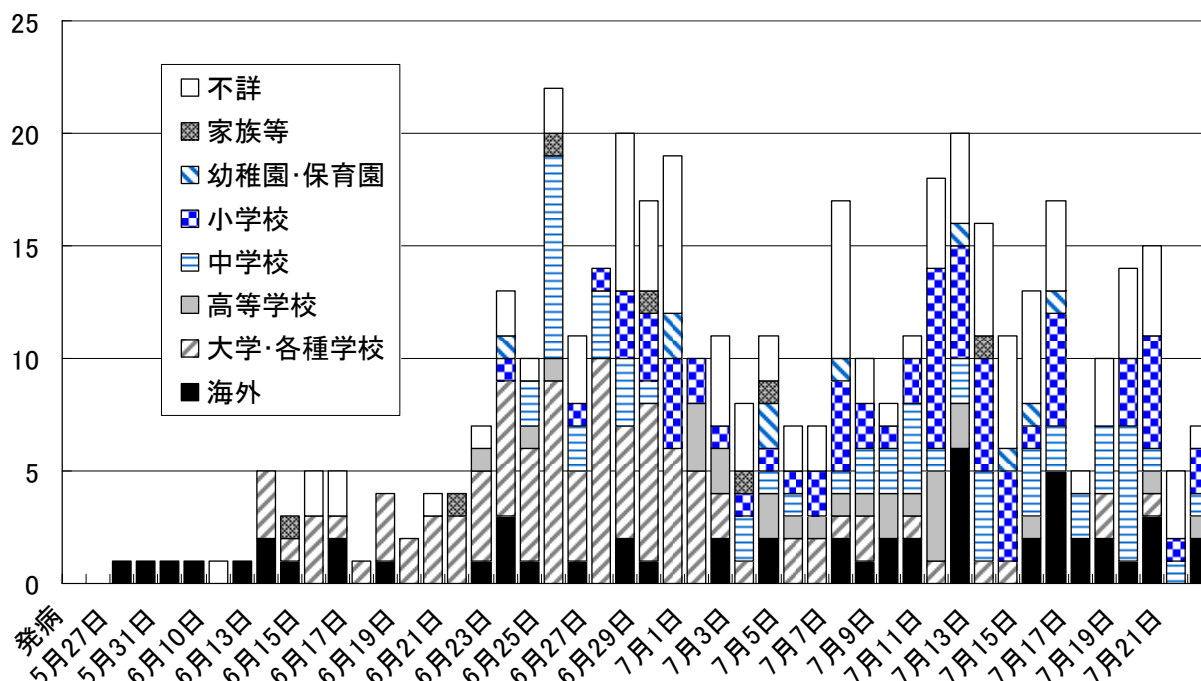


図3 新型インフルエンザA/H1N1全数報告期における発症日別発生状況(愛知県)

2. 退院時陰性確認検査(陰性確認)

愛知県第1例患者を探知した6月1日の時点で「新型インフルエンザ等感染症」は二類感染症相当、すなわち診断の確定した患者は、重症度や重症化リスク等に係わらず全員感染症指定医療機関に入院した。6月19日に解除されるまでの期間、退院には感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律第26条に基づき「平成11年3月30日健医感発第43号 厚生省保健医療局結核感染症課長通知 感染症の病原体を保有していないことの確認方法について」に準じて「24時間以上の間隔を置いて連続2回採取された検体がいずれもウイルス検査陰性となること(陰性確認)」が求められた。陰性確認検査法は、高感度かつ短時間(8時間以内)に結果の判明するRT-PCRを行うこととなり、さらに医療機関や民間衛生検査所は当時陽性対照(ウイルス株、RNA等)を入手する機会がなかったため既に感染研より陽性対照を受領していた地衛研の担当となった。

患者8名中3名は陰性確認後、5名は6月19日以降陰性確認検査結果に係わらず退院した。推定感染経路は3種類に分けられ、渡航歴のある者4名中3名は海外(北米

あるいはハワイ)より帰国後1日以内に発症していた。症例3は在留中のカゼ様症状を根拠にPCR確認日を第5病日とされ、入院翌日より陰性確認検査対象となった。18~20歳の3名は最初に患者が発生した大学の学生、残り1名は国内出張中に発症した(表2)。

8名全員に対して診断直後よりオセルタミビルが投与され、有熱者は服薬開始後24時間以内に全員解熱した。陰性確認できた3名の発症後日数は8,10,18日とバラバラで、症例3には合計12回もの陰性確認検査を実施した。陰性確認前に退院した5名のうち1名は6病日の検査で陰性を示したが、残り4名の最終検査は陽性であった⁴⁾。

8名の診断時及び陰性確認検体合計17件について、H275Yオセルタミビル感受性・耐性遺伝子マーカーを調査したところ、全てH275H(感受性)であった。

3. インフルエンザ定点医療機関からの報告に基づく患者発生の動向(図1)

7月24日わが国における新型flu全数把握は終了し、31週以降の患者発生状況の把握はクラスター及び入院サーベイランスと定点医療機関からの報告に頼ることとなっ

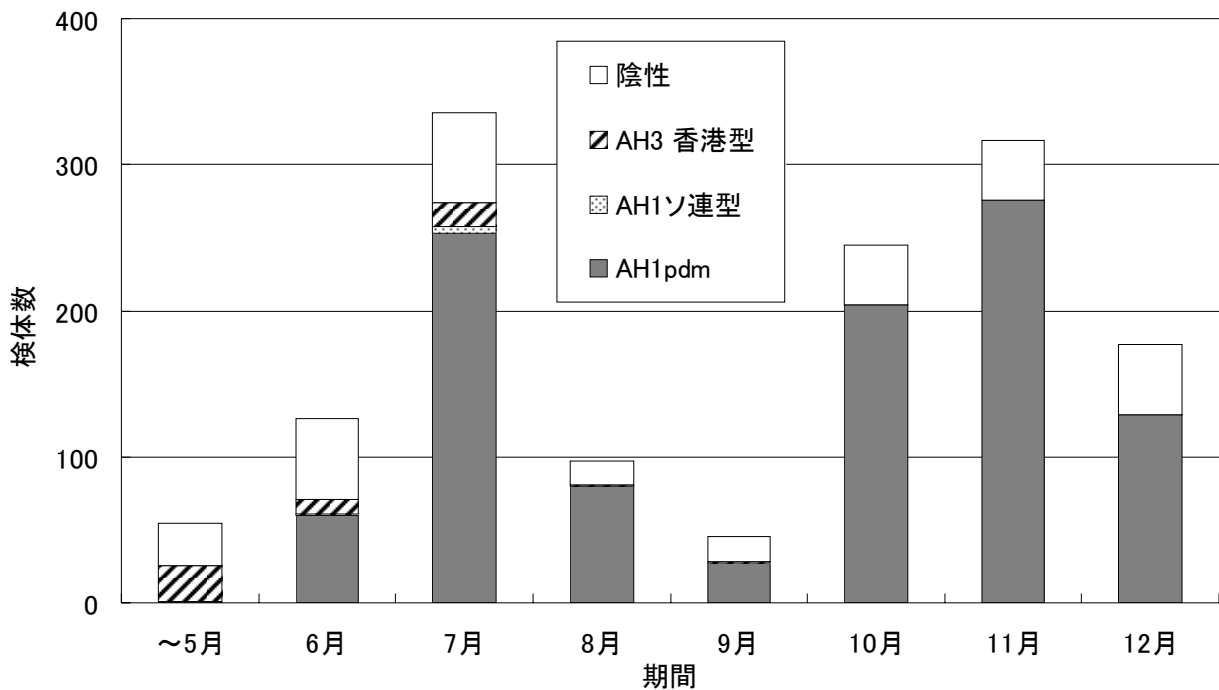


図4 新型インフルエンザA/H1N1 PCR検査におけるA型インフルエンザ遺伝子検出状況（名古屋市を除く愛知県 2009年5月～12月）

た。愛知県の報告数は例年と同様全国の流行に1-2週先んじる形で推移し、37週に注意報レベル、39週には1保健所で定点あたり>30を記録したため10月8日警報が発令された。その後46週にピーク(58.79人)に達したが2005年8週に記録された過去最高値(64.07)を上回る週はなかった。一方パンデミー第1波とみなされる今回の警報発令期間は4ヶ月余に及び、新型flu対策における目標の一つであった「患者発生分散」はある程度達成されたと思われる。

考 察

1. 新型 flu 県内発生前後における当所対応の検証

発生前より機器及び人員が少ないことへの危機感を共有していたためか、海外発生情報入手直後から、県庁によってシーケンサー(遺伝子塩基配列解析装置)等の緊急増設が進められ、当所は当面の間今般の新型 flu 及び関連ウイルス検出の試行・最適化及び検体採取法の広報・調整等、概ね技術分野に専念することができた。

第1、2例確認前にA遺伝子のみ検出限界付近で陽性となる検体2例への対応にお

いて、感染研への送付及び連絡等が提示されたマニュアルどおり進まず行政に迷惑をかけた。幸いこの事例以後は、real RT-PCR陰性変異株や機器トラブル等発生した際にも、検査結果判定保留(最長16時間)として支障なく遂行した。

地衛研でのPCR検査対象やウイルスサーベイランス体制への移行時期を含む、行政全体の初期対応については、新型インフルエンザ行動計画策定等の中心的人物からも再検討の必要性が提起⁹⁾されており、今後さらに検証が必要である。

2. 陰性確認について

陰性確認検査法には高感度(10~100コピー/sample)のreal RT-PCRが選択された。所要時間が比較的短く、当所においてもノロウイルス検査等で日常的に実施されている。real RT-PCRの短所は、試薬及び機器が高価、いったん測定を開始すると数時間の間検体追加は困難で、予定検体がそろうまで検査を開始できない点である。

今回症状消失からPCR陰性化までに日数を要する症例を経験した。陰性確認検査の目的は感染性の否定にあることはいうまで

もないが、オセルタミビル等ノイラミニダーゼ阻害剤の抗ウイルス作用はウイルス出芽抑制であり核酸合成は阻害しない。症例によってはPCR陰性化が個体間感染伝播力の消失よりかなり遅れるように思われた。一方、将来核酸合成阻害剤が実用化された場合には、PCR陰性化が感染性ウイルス粒子消失に先行する可能性も考慮しなければならない。新型flu患者の措置入院中止は、当時国内死亡例がなかったためか冷静に受けとめられたが、将来致死率の高い新型fluが発生した場合PCRによる陰性確認が最良の検査法であるか検討の余地がある。今後陰性確認検査法の評価には感染性消失に要した日数等のデータも有用であろう。

3. パンデミーの各段階に求められる地衛研の機能

3-1 ウイルス検査

感染症法に基づき新型flu感染確定者に対して停留や入院等季節性と異なる対応を要する海外発生から国内発生初期においては、PCRによる迅速検査診断体制の確立と適正な検査キャパシティの維持が必要である。今般は季節性AH1(ソ連型)の散発が続いていたため、さらにH1遺伝子配列決定による迅速な鑑別診断が必要となった。

蔓延期以後は刻々と変異するインフルエンザウイルスを追跡する必要がある。迅速検査から病原体サーベイランスに移行し、抗原性の変化、薬剤感受性や病原性変異を監視に重点を移す必要がある。swH1のreal RT-PCR検査は既に9ヶ月以上継続されているが、開始2ヶ月余り経過時にエスケープする変異体を複数経験したため、遺伝子配列を決定し感染研に報告した¹⁰⁾。ウイルス検査担当者には、変異ウイルスの存在を見逃さない能力が求められる。

3-2 情報提供・研修指導

海外発生直後から、ウイルスの特性や臨床像の特徴等の情報とともに、届出及び検査用検体採取等関係者の実務に直接有用な情報を簡潔に提供する必要がある。

国内及び県内発生後は、毎日患者発生状況等の最新情報をウェブページに提供し、

保健所等への問合せ集中を少しでも緩和すべきである。

蔓延期以後は、通常の週報プラスアルファの状況説明が望まれる。流行開始後激増した感染症発生動向調査定点患者報告数のマスメディア等からの照会に対してはサーベイランスの意義や解釈を伝えるとともに、最新患者報告数公開を木曜日から水曜日に前倒しした。

マスメディアからの主な取材対象は、初めはウイルス検査診断とりわけPCR検査所要時間と最大検体処理数であった。本格的流行入り直前には新型インフルエンザに関する研修会講演依頼があり、大学等に出向いて情報提供する機会となった。

3-3 今後の調査研究

豚由来H1によるパンデミーは約半世紀ぶりであり、初めて感染したH1が昔の豚H1ウイルスである人(55歳以上)、Aソ連型の人(55歳～7歳)、新型fluの人(6歳未満の大半)の間に陽性率、抗体価、ワクチンへの反応等に相違があるのか詳細な血清疫学調査によって解明する必要がある。抗原原罪説のH1亜型内での検証は、ワクチン戦略における有用性が期待される。

防疫対策に資する目的で、薬剤耐性及び病原性変化をもたらす変異の検索と検出法開発が望まれる。患者報告数の解析については、本誌掲載論文¹¹⁾の発展が期待される。

今回の新型fluウイルスA/H1N1は、異なる宿主由来ウイルス間の複雑な再集合reassortmentの産物(豚、鳥、ヒトウイルス由来の遺伝子を保持する三重再集合体triple reassortant)である。今後A香港型など季節性ウイルスとの再集合体が出現する可能性もあり、集団発生病原体の検索や病原体サーベイランスのなかから効率的に変異体を探知する必要がある。このためにはreassortant等変異ウイルス検出法の開発が必要である。

結語

2009年に発生した新型fluパンデミー第1波収束までの期間における当所の対応について、全数報告期を中心に病原体診断と

ウイルスサーベイランス及び愛知県における定点患者報告数の概要とともに記録した。パンデミーは地震等と異なり全国同時多発するため周辺からの人的・物的応援はないことを前提として、平時より人員・設備・備品を備える必要性を痛感した。地域保健の科学的中核機関として地衛研の担うべき役割と現在抱える問題点を再認識する好機となった今般の貴重な経験を、調査研究に反映させるとともに、今後発生する健康危機への対応に生かしたい。

文 献

- 1) 感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律及び検疫法の一部を改正する法律等の施行について(施行通知)厚生労働省健康局長通知, 平成 20 年 5 月 12 日, 健発第 0512004 号.
- 2) Hata M, Tanaka S, Kumagai N, Noma M, Ichinohe K, Hashimoto M, Yamashita T, Minagawa H: Genetic analysis of HA1 gene of Influenza A(H3N2) viruses isolated from returning travelers at Chubu International Airport in Aichi Prefecture, *Jpn J Infect Dis*, 62, 78-80, 2009.
- 3) 厚生労働省:新型インフルエンザウイルス診断検査の方針と手引き(平成 21 年 5 月 1 日), 2009.
- 4) 皆川洋子他:愛知県衛生研究所における新型インフルエンザ(A/H1N1sw1)ウイルス検査体制の構築・維持及び関連情報提供の概要. 厚生労働科学研究費補助金(厚生労働省科学特別研究事業)地方衛生研究所における検査能力の検証と今後の在り方検討分担研究報告書.
- 5) 国立感染症研究所:病原体検出マニュアル H1N1 新型インフルエンザ(2009 年 5 月 ver.1), 2009.
- 6) 国立感染症研究所感染症情報センター「新型インフルエンザ(swine-origin influenza A/H1N1)」ヒト感染例に対する検査診断(医療機関から地方衛生研究所への流れ) Ver.1(2009 年 5 月 1 日), 2009.
- 7) Interim WHO guidance for the surveillance of human infection with swine influenza A(H1N1) virus 27 April 2009 他 WHO 情報, 2009.
- 8) CDC: Outbreak of Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Infection-Mexico, March-April 2009, *MMWR dispatch* 58, 1-3, 2009.
- 9) 押谷 仁:インフルエンザパンデミック(H1N1)2009 を考える, *ウイルス*, 59, 139-144, 2009.
- 10) 皆川洋子, 安井善宏, 小林慎一, 山下照夫: 新型インフルエンザウイルス遺伝子検出における escape mutant への初期対応--地衛研の立場から. 厚生労働科学研究費補助金(厚生労働省科学特別研究事業)地方衛生研究所における検査能力の検証と今後の在り方検討分担研究報告書.
- 11) 續木雅子, 竹島雅之, 広瀬かおる, 判治岳史, 皆川洋子: 愛知県感染症発生動向調査 2009 年定点把握疾病の概要とインフルエンザ罹患数推計, *愛知衛所報*, 60, 1-8, 2010.

Preliminary Report of our Response Against the Emergence and Pandemic of Swine-Origin Influenza A/H1N1 in Aichi Prefecture

(I) Case-Based Surveillance Phase (April through July, 2009)

Hiroko Minagawa, Yoshihiro Yasui, Mami Hata, Shinichi Kobayashi, Miyabi Ito, Noriko Fujiwara, Emi Mizutani, Hirokazu Adachi, Teruo Yamashita, Kyou Shimogishi, Masako Tsuzuki, Masayuki Takeshima, Kaoru Hirose, Takeshi Hanji, Akito Tohyama

Aichi Prefectural Institute of Public Health (IPH) is responsible for viral tests from all 12 prefectural health centers (HCs) and 3 municipal HCs (excluding Nagoya municipal HCs) and is instated with the prefectural infectious disease information center. Since the emergence of pandemic influenza A/H1pdmN1 in Mexico and the United States in 2009 and the declaration of pandemic Phase 4 by World Health Organization on April 27, together with all the other IPH in Japan, it rapidly developed the detection/confirmation protocol of the newly identified swine flu virus, as well as intensified the supply and updating of relevant information. The viral test specimens were at first collected mainly from travelers returning from abroad, and following the report of the first domestic outbreak in Kobe, specimens from school-related outbreak cases were also intensely collected. The first and second pandemic flu cases in Aichi prefecture were confirmed on June 1, and during the case surveillance period until July 24 more than 300 cases were confirmed in Aichi Prefectural IPH. The total number of confirmed cases in Aichi Prefecture including Nagoya City was over 420, ranking third following only Osaka and Kanagawa. Locating within the third largest metropolitan area with an international airport, our intense responses against the emergence and pandemic of swine-origin influenza A/H1N1 were recorded for the purpose of probing and future research. The expected roles for IPH during the pandemic were also discussed.

Key words: pandemic influenza, virus isolation, sequence analysis, negativity confirmation, crisis management

他誌掲載論文抄録

Association between *CYP19A1* polymorphisms and sex hormones in postmenopausal Japanese women

Kumiko Kidokoro¹, Kazuhiko Ino², Kaoru Hirose, Hiroaki Kajiyama², Satoyo Hosono¹, Takeshi Suzuki¹, Takakazu Kawase¹, Akio Hiraki¹, Nobuyuki Hamajima³, Hideo Tanaka¹, Kazuo Tajima⁴, Fumitaka Kikkawa², Keitaro Matsuo¹

¹ Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute

² Department of Gynecology and Obstetrics, Nagoya University Graduate School of Medicine

³ Department of Prevention Medicine/Biostatistics and Medical Decision Making, Nagoya University Graduate School of Medicine

⁴ Aichi Cancer Center Research Institute

Journal of Human Genetics, 54:78-85, 2009

In postmenopausal women, extraovarian sex hormone production plays an important role in hormone-related diseases, such as breast and endometrial cancers. Aromatase, an enzyme encoded by *CYP19A1*, is a key enzyme involved in estrogen biosynthesis. The impact of *CYP19A1* polymorphisms on serum sex hormone levels in the Japanese population has never been investigated. This study enrolled 100 postmenopausal Japanese women found to be without cancer. Twenty-five *CYP19A1* loci were identified, and measurements were conducted on serum levels of sex hormones; lifestyle data were collected, namely estrone(E1), estradiol(E2), testosterone and sex hormone-binding globulin(SHBG). We conducted a cross-sectional analysis to evaluate the impact of *CYP19A1* haplotype on serum sex hormone levels. We found

that subjects with BMI ≥ 25 kg/m² showed a significant difference in circulating testosterone levels (0.29 ± 0.19 , $p=0.050$). Neither age nor the amount of physical exercise or drinking habits showed any effect on hormone levels. We identified seven haplotype blocks in *CYP19A1* by LD analysis. Estrone levels differed in rs12148604 (SNP1) and rs11632903 (SNP14). No significant locus for estradiol was observed. SHBG levels were associated with rs4441215 (SNP11). Testosterone levels were strongly associated with rs752760 (SNP24) and rs2445768 (SNP25) and weakly associated with SNP1, SNP11 and SNP14 as well. We found that polymorphisms in *CYP19A1* influence sex hormone levels in Japanese postmenopausal women.

愛知県におけるスギ・ヒノキ科花粉の2008年飛散結果と2009年飛散予測について

櫻井博貴、続木雅子、広瀬かおる、竹内一仁

東海花粉症研究会誌, 20: 7-14, 2009.

愛知県花粉情報システムにおいて名古屋、一宮、刈谷、豊川、設楽の5か所の観測定点でスギ・ヒノキ科花粉飛散数の測定を実施したところ、愛知県全体の2008年総飛散数は13,850個/cm²と1989年以降の20年で6番目の飛散数であり、前年(33,708個/cm²)の41%、過去20年の幾何平均26,242個/cm²の53%であった。これは、前年に推定した予測飛散数11,300個/cm²の123%であり、尾張部(名古屋、一宮)及び東三河平野部(豊川)では実測飛散数が予測飛散数を下回り、西三河平野部(刈谷)及び三河山間部(設楽)では実測飛散数が予測飛散数を

上回った。2000年から行っている長期予測の予測値と翌年の実測値から求まる回帰式・寄与率はそれぞれ $y=1.331x-4782.5$ 、 $r^2=0.9754$ であり、高い相関を示し8年を通して概ね良好な予測であったと考えられる。

2009年の予測飛散数は愛知県全体で43,800個/cm²と過去20年の実測飛散数の幾何平均26,814個/cm²の163%であると予測した。地域別では尾張部及び三河山間部において2008年の飛散数より増加し、三河平野部では減少すると予測した。

愛知県麻しん全数把握事業における2007年患者報告状況と感染症発生動向調査との比較

続木雅子、広瀬かおる、増井恒夫¹、皆川洋子

¹愛知県精神保健福祉センター

日本公衆衛生雑誌, 56(9):674-681, 2009.

わが国の麻しん発生状況は1999年以来感染症法に基づく発生動向調査定点報告で把握されてきたが、愛知県では麻しん症例の迅速把握と適切な感染拡大防止対策に資することをめざし、2007年2月1日に愛知県麻しん全数把握事業(以下、全数把握事業)が開始された。わが国における麻しん根絶達成の基礎資料とすることを目的に、全数把握事業について発生動向調査データと比較しその成果をまとめた。全数把握事業は県内全医療機関を対象とし、患者住所地(市町村)、性別、診断時年齢、予防接種歴等の各項目に関する報告は医療機関から直接当所へ行われ、情報還元は当所ウェブサイト

を介することで迅速化が図られた。年齢・予防接種歴別集計と同時に、発生動向調査における定点医療機関からの報告状況と比較検討した。その結果、2007年感染症発生動向調査では56人[麻しん45人(80.4%)、成人麻しん11人(19.6%)]の報告に対し、全数把握事業(2007年2月1日~12月31日)には212人[麻しん89人(42.0%)、成人麻しん123人(58.0%)]の報告があり、発生動向調査では捕捉されなかった15歳以上の成人麻しんが感知された。患者報告総数212人のうち予防接種歴ありは56人(26.4%)でprimary/secondary vaccine failureが示唆された。また、予防接種歴なし

88人(41.5%)、不明68人(32.1%)と、予防接種徹底や接種歴の記録保存よびかけの必要性などが、今後の麻しん対策を検討する上での課題として明らかになった。感染症法改正により

2008年1月から麻しんは全数報告疾病となったが、それに先駆け実施された全数把握事業は、監視体制の強化により麻しん発生の正確で迅速な把握が可能となることを示した。

Seroepidemiological study of norovirus infection in Aichi Prefecture, Japan

Shinichi Kobayashi, Noriko Fujiwara, Naokazu Takeda¹, Hiroko Minagawa

¹Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases

Microbiology and Immunology, 53(6): 356–359, 2009.

The serological prevalence of IgG antibody to seven NoV strains (GI.1, GI.4, GII.3, GII.4, GII.10, GII.12 and GII.15) among inhabitants aged 1–62 years of Aichi Prefecture, Japan was studied. Age-related seroprevalence was measured by ELISA using baculovirus-expressed recombinant

VLP antigens. Seropositive rates for all seven VLP antigens gradually increased with age. Among the tested antigens, the highest seropositive rate was for the GII.4 strain. This result is consistent with the recent epidemic of NoV infection due to GII.4 strain in Japan.

Oseltamivir-resistant influenza A viruses circulating in Japan

Daisuke Tamura ¹, Keiko Mitamura ², Mashiko Yamazaki ³, Motoko Fujino ⁴, Mari Nirasawa ⁴, Kazuhiro Kimura ⁵, Maki Kiso ¹, Hideaki Shimizu ⁶, Chiharu Kawakami ⁷, Satoshi Hiroi ⁸, Kazuro Takahashi ⁸, Mami Hata, Hiroko Minagawa, Yoshiaki Kimura ⁹, Satoko Kaneda ⁹, Shigeo Sugita ¹⁰, Taisuke Horimoto ¹, Norio Sugaya ¹¹, Yoshihiro Kawaoka ^{1,12,13}

¹ Division of Virology, Department of Microbiology and Immunology, Institute of Medical Science, University of Tokyo

² Department of Pediatrics, Eijyu General Hospital

³ Department of Pediatrics, Zama Children's Clinic

⁴ Department of Pediatrics, Saiseikai Central Hospital

⁵ Department of Pediatrics, Isehara Kyodo Hospital

⁶ Kawasaki City Institute of Public Health

⁷ Yokohama City Institute of Public Health

⁸ Osaka Prefectural Institute of Public Health

⁹ Tottori Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science

¹⁰ Equine Research Institute, Japan Racing Association

¹¹ Department of Pediatrics, Keiyu Hospital

¹² International Research Center for Infectious Disease, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Department of Pathological Science

¹³ Department of Pathobiological Science, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison

Journal of Clinical Microbiology, 47(5):1424-1427, 2009.

Surveillance studies of the influenza viruses circulating in Europe and other countries in 2007 and 2008 have revealed rates of resistance to oseltamivir of up to 67% among H1N1 viruses. In the present study, we examined 202 clinical samples obtained from patients infected with H1N1 virus in Japan in 2007 and 2008 for oseltamivir resistance and found that three were oseltamivir resistant (1.5%). The 50% inhibitory concentrations (IC(50)s), as measured by a sialidase inhibition assay with these drug-resistant viruses, were >100-fold higher than those of the

nonresistant viruses (median IC(50), 12.6 nmol/liter). The His274Tyr (strain N2 numbering) mutation of the neuraminidase protein, which is known to confer oseltamivir resistance, was detected in these three isolates. Phylogenetic analysis showed that one virus belonged to a lineage that is composed of drug-resistant viruses isolated in Europe and North America and that the other two viruses independently emerged in Japan. Continued surveillance studies are necessary to observe whether these viruses will persist.

ヒトパレコウイルス

伊藤雅、山下照夫、皆川洋子

臨床と微生物, 36 (3) :187-192, 2009.

ピコルナウイルス科に分類されるヒトパレコウイルス (Human parechovirus: HPeV) は主に小児の胃腸炎や呼吸器疾患患者から分離される。同科エンテロウイルス属エコーウイルス 22 型及び 23 型がウイルス学的特徴から 1999

年にパレコウイルス属として独立し、ヒトパレコウイルス 1 型 (HPeV-1) 及び 2 型 (HPeV-2) と改名された。2009 年 2 月現在、世界中から 14 血清型/遺伝子型の報告がある。

Identification of the clonal complexes of *Staphylococcus aureus* strains by determination of the conservation patterns of small genomic islets

Masahiro Suzuki, Masakado Matsumoto, Masao Takahashi, Yasue Hayakawa¹, Hiroko Minagawa
¹ National Hospital organization, Nagoya Medical Center
 Journal of Applied Microbiology, 107(4):1367-1374, 2009.

Aims: To investigate the clonality of *Staphylococcus aureus* isolates, it is important to identify their clonal complexes (CCs) with multilocus sequence typing (MLST). However, it is expensive to carry out MLST analyses for many isolates. The aim of this study, therefore, was to develop a cost effective method to identify CCs by determining the conservation pattern of 'small genomic islets' (SGIs). SGIs are non-conserved regions between strains and have single or multiple open-reading frames (ORFs).

Methods and Results: The whole-genome sequences of nine strains were compared in order to select 16 SGIs. The conservation patterns of the 16 SGIs (islet patterns) were

investigated in 136 *S. aureus* isolates, which were classified into 21 CCs. The islet patterns (IPs) exhibited a one-to-one correspondence with the CCs, except for isolates belonging to CC1, CC5, and CC8. The IPs typical of strains belonging to CC1, CC5, and CC8 differed between those of sequence type 1 (ST1) and ST188 (CC1), ST5 and ST6 (CC5), and ST8 and ST239 (CC8).
Significance and Impact of the Study: The CCs of many isolates can be identified in an easy and inexpensive manner by detecting these 16 SGIs. Emergent clones, particularly methicillin-resistant ones, can be identified by examining numerous islets by islet pattern analysis.

Usefulness of phage open-reading frame typing method in an epidemiological study of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections

Toshi Nada¹, Teruko Ohkura¹, Yoshitaka Morishita¹, Hisashi Baba^{1,2}, Junki Takamatsu¹, Michio Ohta³, Masahiro Suzuki

¹ Department of Clinical Laboratory, Nagoya University Hospital

² Department of Infectious Diseases, Nagoya University Hospital

³ Department of Bacteriology, Nagoya University Graduate School of Medicine

Japanese Journal of Infectious Diseases, 62(5):386-389, 2009.

A novel genotyping method for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), the phage open-reading frame typing (POT) method, was evaluated using 92 MRSA isolates collected from blood

cultures between 1991 and 2003 at Nagoya University Hospital. These strains were divided into 64 distinct POT types, classified into 21 genotypes by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using *Sma*I, and

analyzed with the DICE coefficient of 80% in dendrogram analysis, with 48 types analyzed with the DICE coefficient of 100%. The discriminatory indices of these three methods were 0.988, 0.719, and 0.953, respectively. The first and second prevalent PFGE subtypes A1 and A2, which compared 16 and 13 isolates recovered serially during the study period, were both divided into 11 distinct POT types. Six isolates belonging to PFGE subtype A1 were indistinguishable

with POT. The six isolates were probably involved in an outbreak. Phenotypic analysis suggested that these isolates were the siblings of the New York/Japan clone which are prevalent in many Japanese hospitals. In conclusion, in the strain population studied, POT is a more rapid and discriminatory method than PFGE, and is a useful epidemiological tool for evaluating the available clinical information.

PFGE 型別法の改善後における *Clostridium difficile* の院内分布の解析

奈田俊¹、鈴木匡弘、大蔵照子¹、中西由起子¹、望月まり子¹、馬場尚志^{1, 2}、八木哲也³

¹名古屋大学医学部附属病院検査部

²名古屋大学医学部附属病院難治感染部

³名古屋大学医学部附属病院中央感染制御部

日本臨床微生物学雑誌, 19(4) 205-212, 2009

2004年1月から2008年12月までの5年間に、糞便検体から分離された *Clostridium difficile* (*C. difficile*) は340株であったが、そのうちトキシン遺伝子型を248株で決定したところ、A+/B+が141株(56.9%)、A-/B+が26株(10.5%)、A-/B-が81株(32.7%)であった。トキシン遺伝子保有株のうち136株について、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による型別解析を実施し、病院内での分布状態を調べた。PFGE型では型別不能であった4株を除いた132株がデンドログラム解析で51種類に分類された。そのうちA型からL型までの12種類には85株(62.5%)が含まれ、複数

患者由来であったが、残りの39種類には47株(34.6%)が含まれ患者固有の型であった。35株(25.7%)が最も多いA型であったが、この型は泳動bufferと泳動用ゲルに200μMチオ尿素を添加しない方法ではスメア状態で型別不能であった。一方、C型の菌は全てトキシン型A-/B+であった。A型、B型、J型は同一年内で同一病棟からの分離例があり、施設内伝播も疑われた。同一のPFGE型の菌が最長5年間分離される例もあり、*C. difficile* は芽胞を形成し院内環境に長期間生存しているか、または長期間にわたり人体から検出されることが示された。

LC-MSによる農産物中デメトン-S-メチル、オキシデメトンメチルおよびデメトン-S-メチルスルホンの分析

上野英二、椛島由佳、大島晴美、大野 勉、根本 了¹、米谷民雄^{1, 2}

¹ 国立医薬品食品衛生研究所

² 静岡県立大学

食品衛生学雑誌, 50: 64-69, 2009.

農産物中のデメトン-S-メチル、オキシデメトンメチル、及びこれらの酸化生成物であるデメトン-S-メチルスルホンを定量するための同時分析法を検討した。抗酸化剤としてL-アスコルビン酸及びブチルヒドロキシトルエンを添加した試料から、アセトンで抽出し、多孔性ケイソウ土カラムを用いて酢酸エチルに転溶後、脂質の多い玄米及び大豆はへ

キサン/アセトニトリル分配により脱脂、次いで色素の少ない玄米、大豆及びばれいしょはPSAカラム、それ以外はグラファイトカーボン/PSA 連結カラムを用いて精製し、ESI-SIM モードLC-MSで測定した。玄米など10種類の試料からの平均回収率は73.8～102.5% (相対標準偏差 \leq 5.7%)と良好であった。

多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィーの農薬残留分析への利用 (講座)

上野英二

日本農薬学会誌, 35: 74-78, 2010.

昭和40～50年代から技術を蓄積してきた団塊の世代が残留分析の第一線から退きつつある。このため食品衛生法の試験を行っている検査施設を始めとして、多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィーなどの経験を積んでいる分析技術者が少なくなっている。著者は、日本の厳格なポジティブリスト制度に対応する試験法を開発するにあたって、分析上の問題点の多い多成分残留農薬をジクロロメタンなどの塩素系溶媒を用いることなく、複雑な成分

で構成される加工食品を始めとする様々な食品中から抽出し、精製を可能とする多孔性ケイソウ土の優れた効率性や環境性能などに着目している。そこで、多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィーの原理などについて解説した上で、具体的な応用例として食品の残留分析に用いられている脱水・抽出法及び脱脂・精製法を紹介しながら、分析上のノウハウなどについて解説した。

食品中に含まれる微量農薬の分析法と精度管理体制の構築に関する研究

小島幸一¹、尾花裕孝²、畠山えり子³、土田由里子⁴、上野英二、田中健⁵、田中敏嗣⁶、河瀬志保

7、堤 泰造⁸、衛藤修一⁹

¹ (財) 食品薬品安全センター

² 大阪府立公衆衛生研究所

³ 岩手県環境保健研究センター

⁴ 新潟県保健環境科学研究所

⁵ 奈良県保健環境研究センター

⁶ 神戸市環境保健研究所

⁷ 広島市衛生研究所

⁸ 徳島県保健環境センター

⁹ 北九州市環境科学研究所

厚生労働科学研究補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）「検査機関の信頼性確保に関する研究」小島幸一〈主任研究者〉、尾花裕孝〈分担研究者〉

平成 20 年度分担研究報告書：23-117, 2009.

食品衛生法の残留農薬基準は、農作物の収穫後などの残留を監視するために、主に生鮮食品を対象に設定されてきた。しかし、平成 20 年 1 月に中国製冷凍ギョーザ中メタミドホスの原因とする健康被害が発覚するなど、加工食品の安全性に対する不安が急激に拡大した。このため、加工食品に対する農薬分析の需要が喚起された。そこで、加工食品の分析法を種々検討し、レトルトカレーに比較的毒性の高い有機リン系農薬及びカーバメート系農薬を添加した試

料を用いて、地方衛生研究所 9 機関による外部精度管理などを実施した。その結果、Xbar-R 管理図などが適正域に入ったのは 2 機関のみであった。これは、レトルトカレーが複雑なマトリックスを含む測定困難な試料である上に、極性が高いなど分析上の問題点が多いアセフェート、メタミドホスなどの農薬が含まれていたことが原因と考えられた。しかし、加工食品の分析は主としてスクリーニングであり、有事に際した即応性は高く評価できた。

畜水産食品中の残留農薬の実態

加藤保博¹、根本 了²、上野英二

¹ (財) 残留農薬研究所、² 国立医薬品食品衛生研究所

厚生労働科学研究補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）「食品中に残留する農薬等におけるリスク管理手法の精密化に関する研究」加藤保博〈主任研究者〉、根本 了〈分担研究者〉

平成 20 年度分担研究報告書：15-37, 2009.

平成 20 年度は、引き続き愛知県において市販の畜水産食品中の残留農薬の実態調査を行った。筋肉 28 検体、牛乳 4 検体、卵 6 検体及び魚介類 24 検体の合計 62 検体について、302 農

薬の調査を実施したところ、BHC 類、DDT 類、イソプロチオラン、オキサジアゾン、ダイアジノンなど 32 種類の農薬が痕跡～9 ng/g 検出された。BHC 類が最も高頻度で検出され、62 検体

中 8 検体から検出された。また、前年と同様、種類の農薬が痕跡～6 ng/g 検出された。貝類では 1 検体から複数の農薬が検出される事例が多く見られ、そのうち 1 検体からは 16

逆相 TLC/スキャニングデンシトメトリーによる生薬分析 —ヤクチ、インヨウカク、シコン、ダイオウ、モッコウ、クジンの確認試験—

池田清栄、三上栄一、大野 勉

生薬学雑誌, 63 : 6-9, 2009.

第十五改正日本薬局方収載生薬であるヤクチ、インヨウカク、シコン、ダイオウ、モッコウ及びクジンについて、逆相 TLC/スキャニングデンシトメトリーによる主成分の確認試験方法を開発した。日局収載の生薬は、原則的に、順相の TLC により同定されるが、ヤクチには確認試験が設定されていない。一方、モッコウ、クジンの確認試験は、呈色反応によるものである。これら生薬も TLC による確認試験の設定が必要と考えられたので、三種類の生薬に対して、逆相 TLC による分析法を開発した。加えて、確

認試験に順相 TLC が適用されているインヨウカク、シコン、ダイオウにも逆相 TLC による確認試験を適用した。逆相 TLC を用いることにより、展開溶媒に水、アセトニトリル等の非ハロゲン系の溶媒を選択することができるため、人体及び環境に負荷をかけない確認試験法を開発することができた。本法は、*R_F* 値の 6 回繰り返し再現性試験においても CV 値が 1.0%以下と精度に優れていた。生薬の主成分を、簡易、迅速、確実に同定することが可能であった。

シアン化物イオン及び塩化シアンの分析における緩衝液の検討

中橋千春、大沼章子、小池恭子、伊藤徹、猪飼誉友、川瀬まさ子、大野勉

水道協会雑誌, 78: 14-19, 2009.

告示法のシアン化物イオン及び塩化シアン分析法で用いられている酒石酸緩衝液に代わる緩衝液として、酸性リン酸緩衝液を検討した。その結果、同緩衝液を採水時に用いた場合、酒石酸緩衝液と同等の緩衝能が認められただけでなく、結合残留塩素及びアンモニア態窒素が含まれる試料においても塩化シアンを生成す

るという問題がないことが明らかとなった。また、標準液の調製に用いた場合、塩化シアンの安定性において同緩衝液は酒石酸緩衝液より優れていた。以上より酸性リン酸緩衝液は、酒石酸緩衝液に代わる緩衝液として使用できると考えられる。

編集情報運営委員会

委員長 : 遠山 明人 (研究監)
副委員長 : 判治 岳史 (企画情報部)
委員 : 石田 勝寿 (総務課)
 續木 雅子 (企画情報部・健康科学情報室)
 山下 照夫 (生物学部・ウイルス研究室)
 鈴木 匡弘 (生物学部・細菌研究室)
 藤浦 明 (生物学部・医動物研究室)
 大島 晴美 (衛生化学部・医薬食品研究室)
 伊藤 徹 (衛生化学部・生活科学研究室)

愛知県衛生研究所報

第 60 号

平成 22 年 3 月 発行

〒462-8576 名古屋市北区辻町字流 7 番 6

愛知県衛生研究所

所長 皆川洋子

愛知県衛生研究所ウェブサイト : <http://www.pref.aichi.jp/eiseiken>

電話 : ダイヤルイン

所長 052-910-5604

次長 052-910-5683

研究監 052-910-5684

総務課 052-910-5618

企画情報部長
健康科学情報室 052-910-5619

生物学部長 052-910-5654

ウイルス研究室 052-910-5674

細菌研究室 052-910-5669

医動物研究室 052-910-5654

衛生化学部長 052-910-5638

医薬食品研究室・生活安全化学担当 052-910-5638

医薬食品研究室・食品安全化学担当 052-910-5639

医薬食品研究室・医薬品化学担当 052-910-5629

生活科学研究室・水道水質担当 052-910-5643

生活科学研究室・環境水質担当 052-910-5644

生活科学研究室・環境保健担当 052-910-5664

FAX : 052-913-3641

e-mail: eiseiken@pref.aichi.lg.jp

Published by

AICHI PREFECTURAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH
7-6 Nagare, Tsuji-machi, Kita-ku, Nagoya, 462-8576 Japan

(この刊行物は再生紙を使用しています)